

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Biología Vegetal I (Botánica)**



**TESIS DOCTORAL**

Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la  
producción de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* VAHL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jaime Usano Alemany**

Director

**Jesús Palá Paúl**

**Madrid, 2012**

ISBN: 978-84-695-6366-3

© Jaime Usano Alemany, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES Y  
AGRONÓMICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES  
DE *Salvia lavandulifolia* VAHL.**

TESIS DOCTORAL

JAIME USANO ALEMANY

**MADRID, 2012**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES Y  
AGRONÓMICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES  
DE *Salvia lavandulifolia* VAHL.**

TESIS DOCTORAL

Memoria que para optar al grado de Doctor en Biología presenta:

JAIME USANO ALEMANY

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Jesús Palá Paúl



**A Daniel y María**

*Vuestro recuerdo me bastará*

“He fallado más de 9000 tiros en mi carrera, he perdido casi 300 juegos, 26 veces han confiado en mí para el tiro que ganaba el partido y he fallado. He fracasado una y otra vez en mi vida. Y por eso he alcanzado el éxito”.

*Michael “Air” Jordan*

Y será preciso no olvidar la lección: saber, a cada instante, que en el gesto que hacemos hay un arma escondida, saber que estamos vivos aún. Y que la vida todavía es posible, por lo visto.

*Jaime Gil de Biedma*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro han contribuido a que este proyecto que iniciamos hace años haya dado sus frutos:

Al Dr. Jesús Palá Paúl, por haber aceptado desde el primer momento la dirección de este trabajo. Gracias por haberme abierto las puertas del departamento, por tu ayuda, y por haber compartido desde hace años este ilusionante proyecto en común.

A la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, por la concesión de la beca-predoctoral que me permitió iniciar mi carrera investigadora y trabajar en el Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca), pudiendo comenzar así mis estudios de doctorado.

Al proyecto PII10-0001 “Estudio de los efectos ambientales y agronómicos sobre la producción de aceites esenciales (calidad y cantidad de los principios activos) en plantas aromáticas y medicinales de interés para Castilla-La Mancha. Aplicaciones prácticas para el sector”, concedido por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, gracias al cual he podido realizar todas las labores descritas en este trabajo y presentar en reuniones científicas y congresos los resultados obtenidos, además de ampliar mi formación y experiencia en el campo de las plantas aromáticas y medicinales.

A los directores que ha tenido el C.I.A de Albaladejito durante mi periodo como trabajador del centro, en especial, a Joaquín Cuadrado Ortiz. Gracias Joaquín por no haber escatimado voluntad ni esfuerzos en ayudarme desde el primer día que llegué a Albaladejito.

A David Herraiz Peñalver, investigador del C.I.A de Albaladejito. Gracias David por haberte involucrado con este proyecto desde el principio y por haberme ayudado más allá de donde queda el trabajo. No tengo duda de que sin ti esto no hubiera sido posible. Además, quiero agradecerle los buenísimos momentos tanto dentro como fuera del centro. Pero lo mejor de todo es que estoy convencido de que vendrán más.

A Brígido López de Benito y Orencio Sanchez Ruíz, por su atención y cuidados de las aromáticas del centro. Todo ha sido mucho más fácil con su excelente disposición y su buenhacer.

A Paco, Tere, Agustín y M<sup>a</sup> Ángeles, con los que he compartido muchas horas de despacho. Gracias por vuestra ayuda y predisposición. También quiero agradecerlos



los buenos momentos vividos en el centro y el grandísimo recuerdo que me llevo de mi paso por Albaladejito.

Al resto de los compañeros y trabajadores del C.I.A de Albaladejito. Gracias a todos por haberme hecho más fácil mi estancia en el centro y por haber tenido vuestra ayuda siempre que la necesité. El compañerismo y el buen ambiente de trabajo es lo que han definido los años vividos en el centro.

A los investigadores Ramón Bienes Allás, Federico Varela Nieto y Ángeles Cases Capdevila, por haberme permitido participar en otros proyectos de investigación relacionados con las plantas aromáticas y medicinales y, haber podido de esta manera, ampliar mi experiencia profesional.

A la Dra. Silvia Díaz del Toro. Gracias Silvia por tus consejos, por tu disposición y por tu ayuda.

A Manuel Santa-Cruz Rodríguez. Gracias Manu, en primer lugar, por tu amistad y compañerismo durante nuestro paso por la facultad. Además, quiero agradecerte tu inestimable ayuda y tu eficaz trabajo “codo con codo” con las salvias.

A mis amigos y compañeros de la facultad. Gracias, principalmente a Raúl, Ives, Laura, Esther, Pablo, Patri, Carmen, Oli y Ana. Aprovecho esta oportunidad para agradecer a todos vuestro compañerismo y amistad.

A mis amigos. Gracias David, Darío, Samu, Lucas, Miguel, Rafa, Noe, Alba, Josu, Angelines y Tania, por compartir conmigo tantos momentos, buenos y malos, aunque con vosotros, al final, todo el tiempo es especial e irrepetible.

Especialmente, a mi familia. A mis padres y a mis hermanos por sus sacrificios, su apoyo incondicional y por animarme a no desistir nunca hasta conseguir las metas marcadas. De manera especial quiero dar las gracias a mi hermano David. Como a otros, te tocó soportar la Cruz más pesada. Tu ánimo y fortaleza, siempre implacables, son fuente de inspiración para todos nosotros. También a mis tíos y mi abuela con los que conviví durante mis años de carrera en Madrid y que no dudaron en brindarme la oportunidad de cumplir este sueño.

Y quizá me olvide de mucha gente, para ellos va también este agradecimiento.

# ÍNDICE

Página

<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	21
<b>I.1. ANTECEDENTES</b> .....	21
<b>I.2. IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>SALVIA</i></b> .....	26
I.2.1. Fitoquímica y aspectos farmacológicos del género <i>Salvia</i> .....	27
<b>I.3. LA SALVIA ESPAÑOLA (<i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.)</b> .....	31
I.3.1. Estudios previos .....	34
I.3.1.1. Estudios clínicos .....	34
I.3.1.2. Estudios fitoquímicos y quimiotaxonómicos .....	34
I.3.1.3. Otros estudios .....	35
<b>I.4. LOS ACEITES ESENCIALES</b> .....	36
I.4.1. Métodos extractivos, analíticos y de conservación .....	41
I.4.1.1. Métodos extractivos .....	41
I.4.1.1.1. Procesos industriales .....	42
I.4.1.1.2. Procesos a escala de laboratorio .....	43
I.4.1.2. Métodos analíticos .....	44
I.4.1.3. Conservación del aceite esencial .....	45
I.4.2. Situación actual del mercado de los aceites esenciales .....	45
I.4.3. Los aceites esenciales de la salvia española y su normativa .....	47
I.4.4. Factores ambientales que afectan a la producción y a la composición química de los aceites esenciales .....	51
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	58
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES</b> .....	59
<b>III.1. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN</b> .....	59

III.2. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y COMPUESTOS VOLÁTILES .....	60
III.2.1. Análisis químicos .....	60
III.2.2. Identificación y cuantificación de los compuestos .....	61
III.3. ANÁLISIS DE SUELOS .....	63
IV. ESTUDIOS .....	66
IV.1. VARIACIÓN INTRA E INTERPOBLACIONAL DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>S. lavandulifolia</i> Vahl. Y SU RELACIÓN CON EL ÁREA DE ORIGEN .....	67
IV.1.1. Introducción .....	67
IV.1.2. Material y Métodos .....	69
IV.1.2.1. Prospección, recolección de material vegetal, conservación de germoplasma y caracterización química de los aceites esenciales de poblaciones naturales de <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl. ....	69
IV.1.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales .....	73
IV.1.2.3. Análisis de suelos .....	73
IV.1.2.4. Análisis de datos .....	73
IV.1.3. Resultados .....	74
IV.1.3.1. Rendimiento en aceite esencial .....	74
IV.1.3.2. Composición química .....	77
IV.1.4. Discusión .....	88
IV.2. SEGUIMIENTO FENOLÓGICO DE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE DIVERSOS CLONES DE <i>S. lavandulifolia</i> Vahl. ....	96
IV.2.1. Introducción .....	96
IV.2.2. Material y Métodos .....	99
IV.2.2.1. Selección de los genotipos para el estudio .....	99
IV.2.2.2. Multiplicación vegetativa .....	99
IV.2.2.3. Implantación en campo de cultivo .....	100
IV.2.2.4. Recolección periódica de material vegetal .....	101

IV.2.2.5. Caracterización bio-edafo-climática .....	102
IV.2.2.5.1. Características edafológicas .....	103
IV.2.2.5.2. Registro climatológico .....	103
IV.2.2.5.3. Registro de la humedad del suelo .....	104
IV.2.2.6. Análisis de datos .....	104
IV.2.3. Resultados .....	105
IV.2.3.1. Rendimiento en aceite esencial .....	106
IV.2.3.2. Composición química .....	107
IV.2.3.3. Influencia del estrés hídrico .....	122
IV.2.4. Discusión .....	127
IV.2.4.1. Rendimiento en aceite esencial .....	127
IV.2.4.2. Composición química .....	132

#### IV. 3. DIVERSIDAD EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TALLOS, HOJAS Y FLORES DE *S. lavandufolia* Vahl. ....

IV.3.1. Introducción .....	143
IV.3.2. Material y Métodos .....	144
IV.3.2.1. Material vegetal .....	144
IV.3.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales .....	145
IV.3.3. Resultados.....	145
IV.3.4. Discusión .....	146

#### IV.4. INFLUENCIA DEL ABONADO NITROGENADO EN EL RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *S. lavandulifolia*.Vahl. ....

IV.4.1. Introducción .....	149
IV.4.2. Material y Métodos .....	151
IV.4.2.1. Material vegetal y diseño experimental .....	151
IV.4.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales .....	152
IV.4.2.3. Análisis de datos .....	152
IV.4.3. Resultados .....	152
IV.4.3.1. Rendimiento en aceite esencial .....	153
IV.4.3.2. Composición química .....	154

IV.4.4. Discusión .....	155
<b>IV.5. VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE <i>S. lavandulifolia</i> Vahl. INDUCIDA POR ESTRÉS DEBIDO A ALTAS TEMPERATURAS</b> .....	159
IV.5.1. Introducción .....	159
IV.5.2. Material y Métodos .....	161
IV.5.2.1. Material vegetal y diseño experimental .....	161
IV.5.2.2. Extracción de los compuestos volátiles .....	163
IV.5.2.3. Análisis de la composición química .....	164
IV.5.3. Resultados .....	164
IV.5.4. Discusión .....	166
<b>IV.6. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>S. lavandulifolia</i> Vahl.</b> .....	170
IV.6.1. Introducción .....	170
IV.6.2. Material y Métodos .....	172
IV.6.2.1. Material vegetal .....	172
IV.6.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales .....	172
IV.6.2.3. Ensayos antimicrobianos (método de difusión en agar) ..	172
IV.6.2.4. Análisis de datos .....	173
IV.6.3. Resultados .....	173
IV.6.4. Discusión .....	177
<b>V. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	180
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	187
<b>VII. ANEXOS</b> .....	189
<b>VII.1. ANEXO I. Composición química de los aceites esenciales</b> .....	189
VII.1.1. Genotipos y poblaciones naturales .....	189
VII.1.2. Seguimiento fenológico .....	195
VI.1.2.1. Campaña 2010 .....	195
VI.1.2.2. Campaña 2011 .....	207

VII.1.3. Abonado nitrogenado .....	210
VII.2. ANEXO II. Análisis de suelos .....	212
VII.3. ANEXO III. Datos meteorológicos. Diagramas ombroclimáticos .....	219
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>221</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Mapa de distribución de <i>Salvia lavandulifolia</i> en la Península Ibérica .....	32
Figura 2.- Biosíntesis de terpenoides. (A) Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides. (B) Monoterpenos mayoritarios en el aceite esencial de <i>S. lavandulifolia</i> .....	40
Figura 3.- Cabeza de destilación para la determinación de aceites esenciales en las drogas vegetales (Real Farmacopaea Española, 2ª ed., 2002). Las dimensiones expuestas son en milímetros .....	60
Figura 4.- Cromatograma del aceite esencial de <i>S. lavandulifolia</i> y espectro de masas de uno de sus componentes. (A) Posición en el cromatograma de los componentes mayoritarios del aceite esencial. (B) Espectro de masas del compuesto 1,8-cineol .....	62
Figura 5.- Ejemplo de itinerario para la recogida de muestras de suelo en parcela .....	63
Figura 6.- Esquema de la recogida de muestras de suelo con azada .....	64
Figura 7.- Rendimiento en aceite esencial de las poblaciones naturales seleccionadas de <i>S. lavandulifolia</i> localizadas en tres pisos bioclimáticos distintos .....	75
Figura 8.- Rendimiento en aceite esencial de los genotipos seleccionados de las cuatro poblaciones de <i>S. lavandulifolia</i> . Las letras en negrita indican las poblaciones, siendo éstas A (Torralba), B (Campillo-Paravientos), C (Huélamo) y D (Huerta del Marquesado). Los números indican la época de la recolección de material vegetal, siendo éstos marzo (1), junio (2) y octubre (3) de 2008, respectivamente .....	76
Figura 9.- PCA de la composición química de los aceites esenciales de las poblaciones de <i>S. lavandulifolia</i> . (A) PCA de distribución de variables. (B) PCA de distribución de las poblaciones .....	79
Figura 10.- Análisis de conglomerados (CA) de la composición química de los aceites esenciales de las poblaciones de <i>S. lavandulifolia</i> utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre poblaciones .....	80

Figura 11.- Diagrama con las dos primeras componentes (F1 y F2) de un análisis PCA de las poblaciones e individuos analizados de <i>S. lavandulifolia</i> . Las letras en negrita indican la posición de las muestras a nivel poblacional .....	83
Figura 12.- Análisis de conglomerados de los doce genotipos seleccionados de <i>S. lavandulifolia</i> utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre genotipos .....	85
Figura 13.- Posición relativa en el espacio definido por tres componentes principales en base a la composición química de los aceites esenciales de los clones de <i>S. lavandulifolia</i> evaluados durante el año 2010 .....	116
Figura 14.- Matriz de correlaciones entre los principales compuestos de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> .....	117
Figura 15.- Evolución anual de los grupos de compuestos. El porcentaje relativo de cada uno de los compuestos que forman los grupos descritos proviene del promedio entre todos los clones evaluados. Cada grupo está formado por la suma de los porcentajes relativos de los compuestos que los forman. El Grupo 1 está representado por el color negro (●), el Grupo 2 por el color verde (■) y el Grupo 3 por el color rojo (♦). La gráfica representa la evolución durante el año 2010 .....	118
Figura 16.- Análisis cluster de acuerdo con la composición química de once genotipos seleccionados de <i>S. lavandulifolia</i> utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre genotipos. Material vegetal recolectado en Octubre de 2011 en el C.I.A de Albaladejito .....	121
Figura 17.- Posición relativa en el espacio definido por tres componentes principales en base a la composición química de los aceites esenciales de los clones de <i>S. lavandulifolia</i> extraídos de material vegetal recolectado en Octubre de 2011 en el C.I.A de Albaladejito .....	121
Figura 18.- Rendimientos medios en aceite esencial ( $\pm$ desviación estándar) de todos los genotipos de trabajo durante los años 2010 y 2011 en los periodos de floración y maduración de las semillas .....	122
Figura 19.- Monitorización de la humedad del suelo en la parcela de cultivo de <i>S. lavandulifolia</i> en el C.I.A de Albaladejito durante el año 2010 y 2011, respectivamente. El año 2011 está representado de enero hasta octubre. Los datos representados son las medias obtenidas por tres sondas dispuestas a 10, 30	



y 40 cm de la superficie del suelo. Las flechas indican los momentos de recolección de material vegetal .....	123
Figura 20.- Temperaturas medias mensuales durante los años 2010 y 2011 en la parcela de cultivo de <i>S. lavandulifolia</i> . Los meses representados son los comprendidos entre el comienzo de la floración y la maduración completa de las semillas .....	124
Figura 21.- Fluctuación en los valores de rendimiento en aceite esencial en <i>S. lavandulifolia</i> . Las letras representan estadios fenológicos: A (comienzo de la floración), B (comienzo de maduración de las semillas) y C (completa maduración de las semillas) .....	129
Figura 22.- Diagrama de las medianas de los distintos tratamientos de abono nitrogenado en algunos de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>S. lavandulifolia</i> . Las líneas horizontales representan a las medianas del porcentaje relativo de cada compuesto en el aceite esencial y las cajas representan los percentiles 25-75% .....	158
Figura 23.- Porcentajes relativos de monoterpenos (●) y sesquiterpenos (○) en <i>S. lavandulifolia</i> en relación con la temperatura de mantenimiento en ambiente controlado. La línea continua representa al genotipo B1 y la línea discontinua al genotipo D3 .....	166
Figura 24.- Cromatogramas característicos de algunos de los genotipos de <i>S. lavandulifolia</i> en estadio de plena floración. Los números indican la posición de los compuestos más característicos de estas esencias. $\alpha$ -pineno (1), canfeno (2), $\beta$ -pineno + mirceno (3), limoneno (4), 1,8-cineol (5), alcanfor (6), borneol (7), <i>trans</i> -cariofileno (8), espatulenol (9), óxido de cariofileno (10) y viridiflorol (11) .....	184

## ÍNDICE DE TABLAS

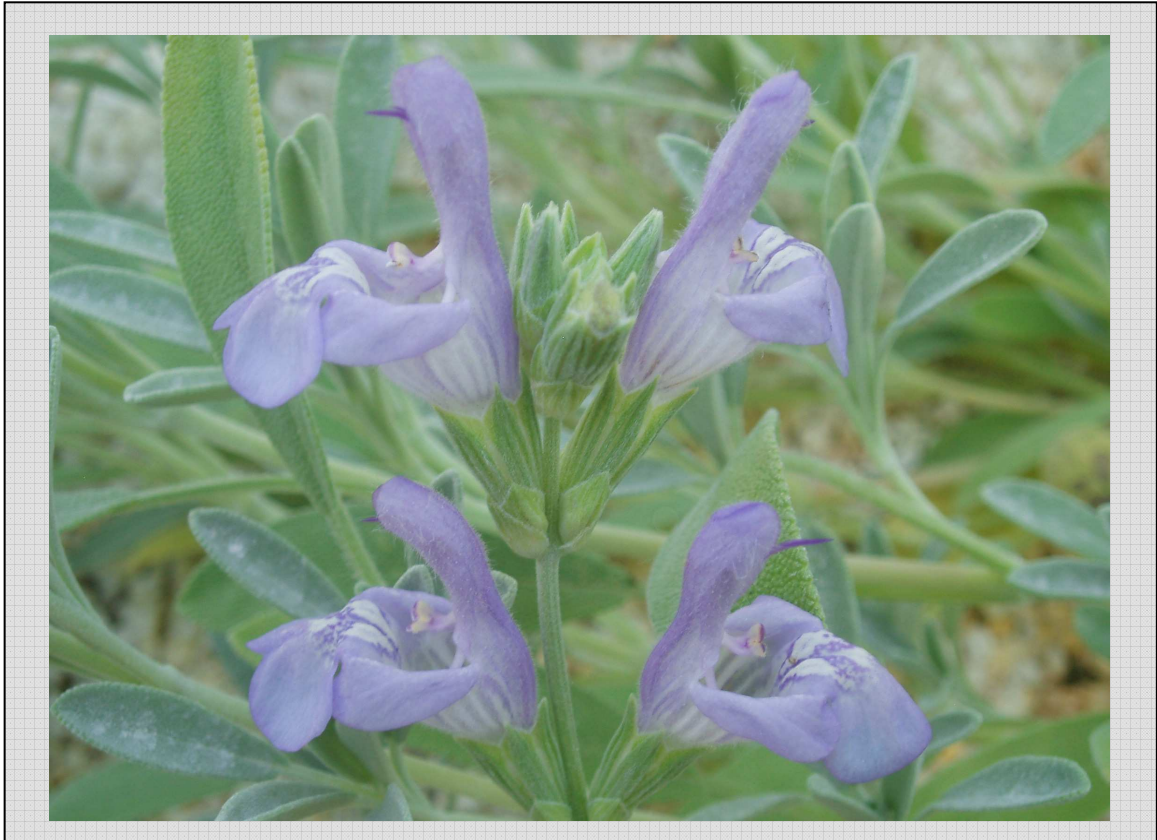
	Página
Tabla 1.- Superficies de cultivos industriales en España durante el año 2009 .....	24
Tabla 2.- Rango en la composición química (%) de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> .....	48
Tabla 3.- Normativa para la composición química del aceite esencial de salvia de España ( <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.) .....	50
Tabla 4.- Condiciones de trabajo y características de los cromatógrafos empleados en los análisis químicos de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> .....	61
Tabla 5.- Localización geográfica de las poblaciones de <i>S. lavandulifolia</i> .....	72
Tabla 6.- ANOVA encajado para el rendimiento en aceite esencial de las poblaciones y genotipos seleccionados de <i>S. lavandulifolia</i> .....	76
Tabla 7.- Composición química de los aceites esenciales de las poblaciones de <i>S.</i> <i>lavandulifolia</i> .....	78
Tabla 8.- Composición química de los aceites esenciales de los genotipos seleccionados .....	82
Tabla 9.- Comparación entre porcentajes relativos descritos en la norma UNE 84310 con la prospección realizada a nivel inter e intrapoblacional de <i>S. lavandulifolia</i> .....	86
Tabla 10.- Estructura de correlación canónica entre los principales compuestos del aceite esencial de <i>S. lavandulifolia</i> y la cantidad de materia orgánica, nitrógeno, potasio y fósforo del suelo .....	87
Tabla 11.- Grupos de genotipos de <i>S. lavandulifolia</i> diferenciados conforme a la composición química de los aceites esenciales .....	93
Tabla 12.- Número, origen e identificación de los genotipos de trabajo .....	102
Tabla 13.- Calendario de cosechas para los genotipos cultivados de <i>S. lavandulifolia</i> .....	103
Tabla 14.- Rendimiento en aceite esencial (%) de los clones de <i>S. lavandulifolia</i> evaluados durante el año 2010 .....	106
Tabla 15.- ANOVA encajado para el rendimiento en aceite esencial de las poblaciones y genotipos seleccionados de <i>S. lavandulifolia</i> .....	107
Tabla 16. Prueba <i>post hoc</i> Tukey HSD para el rendimiento en aceite esencial ....	107
Tabla 17.- Seguimiento anual de los principales constituyentes del aceite esencial de <i>S.</i> <i>lavandulifolia</i> durante el año 2010 .....	109

Tabla 18.- Compuestos evaluados para 66 muestras recolectadas durante el año 2010 provenientes de 11 clones cultivados de <i>S. lavandulifolia</i> .....	119
Tabla 19. Comparación de los principales constituyentes del aceite esencial de <i>S. lavandulifolia</i> durante los años 2010 y 2011 .....	126
Tabla 20.- Contenido en 1,8-cineol de los aceites esenciales de las especies donde se ha descrito como mayor porcentaje relativo .....	134
Tabla 21.- Agrupación del compuesto 1,8-cineol según la metodología expuesta de validación para la presencia de quimiotipos .....	141
Tabla 22.- Composición química de los aceites esenciales de las diferentes partes de <i>S. lavandulifolia</i> .....	146
Tabla 23.- Rendimientos en aceite esencial (%) de <i>S. lavandulifolia</i> en las parcelas de experimentación con dosis de abonado nitrogenado .....	153
Tabla 24.- Porcentajes relativos de los principales compuestos volátiles extraídos de <i>S. lavandulifolia</i> en relación a la dosis de fertilización nitrogenada aplicada al cultivo .....	154
Tabla 25.- Secuencia de condiciones en los ensayos de temperatura con los genotipos B1 y D3 .....	163
Tabla 26.- Porcentajes relativos de los compuestos volátiles mayoritarios de <i>S. lavandulifolia</i> en relación a la temperatura de mantenimiento en cámara de cultivo .....	165
Tabla 27.- Seguimiento estacional de la composición química de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> .....	175
Tabla 28.- Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> .....	176
Tabla A.- Composición química de los genotipos seleccionados de <i>S. lavandulifolia</i> .....	189
Tabla B.- Composición química de los aceites esenciales extraídos de las poblaciones naturales de <i>S. lavandulifolia</i> .....	192
Tabla C.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos A2 y A3 .....	195
Tabla D.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos B1, B2 y B3 .....	198
Tabla E.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos C1, C2 y C3 .....	201

Tabla F.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos D1, D2 y D3 .....	204
Tabla G.- Composición química de los genotipos evaluados durante el año 2011 .....	207
Tabla H.- Abonado nitrogenado. Composición química de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> en la campaña 2010 .....	210
Tabla I.- Abonado nitrogenado. Composición química de los aceites esenciales de <i>S. lavandulifolia</i> en la campaña 2011 .....	211
Tabla J.- Determinación analítica del suelo de la finca de aromáticas del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca) .....	213
Tabla K.- Determinación analítica del suelo (compost) en los ensayos con cámaras de cultivo .....	214
Tabla L.- Determinación analítica del suelo población A (Torralba) .....	215
Tabla M.- Determinación analítica del suelo población B (Campillo-Paravientos) .....	216
Tabla N.- Determinación analítica del suelo población C (Huélamo) .....	217
Tabla Ñ.- Determinación analítica del suelo población D (Huerta del Marquesado) .....	218

## ÍNDICE DE IMÁGENES

	Página
Imagen 1.- Parcela de experimentación con PAM del C.I.A de Albaladejito (Cuenca) .....	23
Imagen 2.- Estructura estaminal del género <i>Salvia</i> .....	26
Imagen 3.- Estructuras de secreción de aceite esencial en distintas partes de <i>S. lavandulifolia</i> . (A) Pétalos. (B) Envés de la hoja. (C) Anteras. (D) Esquema tipo de un tricoma glandular. (1) Célula basal. (2) Célula peduncular. (3) Células secretoras. (4) Aceite esencial (terpenos acumulados). (5) Cutícula .....	38
Imagen 4.- GPS, planos y notas para la localización geográfica de las poblaciones de <i>S. lavandulifolia</i> .....	69
Imagen 5.- Semillas de <i>S. lavandulifolia</i> .....	70
Imagen 6.- Banco de germoplasma (Centro de Investigación Agraria de Albaladejito, Cuenca) .....	70
Imagen 7.- Zona de estudio. Campos de ensayo de PAM del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca) .....	100
Imagen 8.- Cultivo de <i>Salvia lavandulifolia</i> .....	103
Imagen 9.- Halos de inhibición de los aceites esenciales mediante el empleo del método de difusión en agar .....	176



Inflorescencia de *Salvia lavandulifolia* Vahl.



## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### I.1. ANTECEDENTES

El cultivo de plantas aromáticas y medicinales (en adelante PAM o PAMC si se incluyen las plantas condimentarias) forma parte de los cultivos tradicionales de muchas partes de España. Así, cultivos de espliegos (*Lavandula* sp.) o salvias (*Salvia* sp.), por citar algunos, han formado parte del paisaje de muchas zonas de la Península Ibérica. En este contexto, y citando el documento del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino titulado “Aplicación en España del Chequeo Médico de la PAC” (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009): “... El modelo agrario español debe derivar del modelo general de la agricultura europea definido en la PAC. Es decir, una agricultura sostenible, productiva, adecuadamente tecnificada y competitiva, respetuosa con el medio ambiente, integradora de los agricultores en el tejido económico y social del medio rural”, bajo estas premisas, el cultivo de PAM se presenta como una alternativa económica, social y medioambientalmente interesante. El desarrollo de estos cultivos puede desempeñar una labor dinamizadora del sector agrario y, en general, del medio rural, ya que permite diversificar las producciones agrícolas (principalmente en las zonas de secano de bajos rendimientos cerealistas o en zonas con limitaciones naturales o ambientalmente sensibles). Además, puede generar puestos de trabajo asociados a las labores de transformación y comercialización de los productos y mejorar las características paisajísticas de las zonas donde son cultivadas, potenciando otras actividades como el turismo. Otro aspecto a destacar es que, en general, se trata de especies poco exigentes en cuanto a necesidades de fertilización y con escasos enemigos naturales. Por este motivo, se adaptan de manera muy destacada al cultivo ecológico, lo cual genera amplias expectativas de mercado. Por último, estos cultivos están claramente orientados a mercado, ya que su rentabilidad no depende de subvenciones específicas a la producción.

La cantidad de PAM que se produce y comercializa a nivel mundial tiene una estimación de crecimiento medio anual del 7% (Lange, 2004). Globalmente, este mercado aporta unos rendimientos cercanos a los 83.000 millones de dólares (Gruenwald, 2008). En concreto, de este mercado, la industria farmacéutica (incluyendo medicamentos a partir de precursores a base de plantas y registrados como plantas medicinales) contribuye con 44.000 millones de dólares (Gruenwald, 2008). Los



suplementos dietéticos adicionales o alimentos funcionales a base de plantas lo hacen con 25.000 millones de dólares. Los productos de cosmética natural con base de plantas constituyen los restantes 14.000 millones de dólares.

De toda la producción, se sospecha que entre el 60-90% de la materia prima utilizada por las principales compañías que fabrican y comercializan productos elaborados a base de PAM provienen de la recolección silvestre (Laird & Pierce, 2002). La recolección silvestre de estas plantas para su aprovechamiento aromático se lleva a cabo tradicionalmente de forma manual, con el arrancado de la planta, en muchas ocasiones. Ello lleva asociado un cambio en la flora del lugar, lo cual en la mayoría de los casos redundará en un suelo desnudo, sin protección y con alto riesgo de erosión. Las tierras abandonadas en climas semiáridos, como ocurre en una parte importante de la Península Ibérica, lejos de evolucionar hacia una progresiva recuperación de la vegetación autóctona, van degradándose progresivamente y tienden a la desertificación (Lesschen *et al.*, 2007). Las medidas de rehabilitación que emplean arbustos adaptados a condiciones semiáridas aumentan las probabilidades de éxito en condiciones desfavorables (Houerou, 2000). Puesto que la degradación física de un suelo es función de su cobertura vegetal, el ensayo de especies arbustivas en las restauraciones adquiere especial importancia. El desarrollo de estas especies va a incidir sobre la porosidad del suelo (grado de compactación), sobre el contenido de materia orgánica del mismo y, consecuentemente, sobre la estabilidad estructural del suelo (Curtin & Mullen, 2007). En base a esto, especies autóctonas arbustivas de PAM con mercado creciente como el espliego, el romero, la salvia o los tomillos, por citar algunas, constituyen una magnífica alternativa para ciertas zonas degradadas y en proceso de erosión. No obstante, y pese a que el cultivo de una planta aromática (plantación monoespecífica) nunca es igual de efectivo que el de una vegetación espontánea pluriestratificada, es decir, compuesta tanto de vegetación herbácea como arbustiva (Casermeiro *et al.*, 2003), siempre será más efectiva sobre el control de la erosión que el abandono de la parcela, en donde el estrato arbustivo no está presente o tarda años en desarrollarse.



Imagen 1.- Parcela de experimentación con PAM del Centro de Investigación Agraria (C.I.A) de Albaladejito (Cuenca).

En España, el anuario de Estadística Agroalimentaria de 2010 publicado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, recoge los datos de superficies (tabla 1) y rendimientos de cultivos industriales (entre los que se encuentran las PAMC) para el año 2009.

Datos más recientes de la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (E.S.Y.R.C.E., Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2011), muestran como el cultivo de plantas aromáticas representa actualmente en España alrededor de 8000 ha. Además, y según esta misma fuente, este cultivo ha tenido un incremento en su superficie del 63,6% desde 2004. La estructura geográfica del sector permite comprobar una explotación más intensa en determinadas comunidades autónomas:

- Castilla-La Mancha, con 4.317 ha de plantas aromáticas y 183 ha de condimentarias.
- Andalucía, con 2.905 ha de plantas aromáticas y 7.211 ha de condimentarias.

- A estas dos comunidades les siguen, a mucha distancia en importancia, la Comunidad Valenciana con 323 ha, Aragón con 190 ha y la Región de Murcia con 174 ha, todas ellas dedicadas al cultivo de plantas aromáticas.

Tabla 1.- Superficies de cultivos industriales en España durante el año 2009.

CULTIVOS	Área (ha)		
	Secano	Regadío	Total
ESPECIAS			
Anís	4.963	132	5.095
Azafrán	58	85	143
Menta	58	30	30
Comino	9	8	17
Regaliz	22	71	93
OTROS CULTIVOS INDUSTRIALES			
Achicoria	-	11	11
Lavandas y lavandines	1.521	123	1.644
Otros cultivos (*)	6.492	6.908	13.400

(\*) Incluidos aquí exclusivamente cultivos de PAM como el opio, los tomillos, aloes, camomilas y salvias. No se incluyen cultivos para la producción de fibra o aceites.

En general, España es un importante productor de granos de anís, granos de adormidera, hinojo, lavandas y lavandines. Por contra, nuestro mercado es altamente deficitario en clavo, canela, gomas, resinas y bálsamos. Finalmente, cabe destacar la ausencia de datos referidos a plantas de gran incidencia en el mercado internacional como el sen, la digital o la angostura, entre otras.

Según el estudio de Peroy (2003), las especies con mayor demanda en España en los próximos años serán: el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), las salvias (*Salvia officinalis* L. y *Salvia lavandulifolia* Vahl.), la ajedrea (*Satureja montana* L.) y el orégano (*Origanum vulgare* L.).

En el ámbito de la producción relacionada con las PAM, cuatro son los tipos de productos que se comercializan según sea el procesado, la preparación o la transformación:

1. Material vegetal consumido en fresco.
2. Material vegetal consumido seco, constituido por la planta entera o partes de la misma.
3. Extractos. Constituidos mediante la aplicación de diferentes técnicas de extracción de los principios activos.
4. Aceites esenciales. Resultado de procesos de destilación.

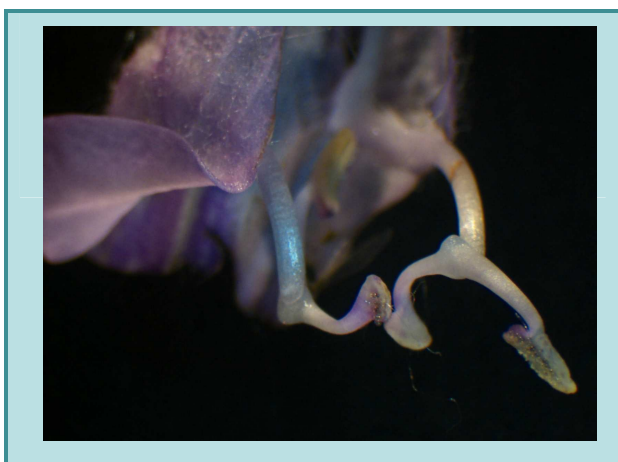
Por último, y finalizando este apartado, destacar que ante esta demanda creciente de PAMC, el mercado necesita materias primas homogéneas, de trazabilidad y calidad conocidas, y con certeza y definición en la periodicidad del suministro. Concretamente, el mercado emergente de la fitoterapia es muy exigente, y para la obtención de medicamentos a base de plantas se necesita materia prima de calidad, seguridad y eficacia contrastadas (Steinhoff, 2003). Estas exigencias sólo se pueden alcanzar con material vegetal que provenga de cultivos cuya trazabilidad sea totalmente contrastable. Además, en Europa se espera que la directiva sobre productos tradicionales a base de plantas medicinales tenga un impacto positivo en el mercado, ya que permite el acceso al mercado a través del registro simplificado. Por otro lado, un registro en un país europeo se aplicará automáticamente al resto de los estados miembros, eliminando los inconvenientes de los diferentes requisitos normativos de cada país, lo cual suponía una gran desventaja para el sector.

La calidad de una planta englobada como PAMC viene determinada por su contenido en metabolitos secundarios y su rendimiento en biomasa. Las producciones provenientes de recolecciones silvestres llevan consigo, en muchos casos, productos de baja calidad y difícil trazabilidad que limita sus posibilidades de mercado. Además se produce el riesgo de una mala identificación de las especies (mezcla de productos), desconocimiento de la calidad y variación de la composición química de las plantas en relación a su ciclo biológico, no consecución de la cantidad demandada por la industria y los referidos problemas medioambientales debidos a la sobreexplotación de las poblaciones naturales. Todo ello, pone de manifiesto la necesidad del fomento del

cultivo de estas especies en España mediante la investigación, experimentación y posterior divulgación de los resultados.

### I.2. IMPORTANCIA DEL GENERO *SALVIA*

El género *Salvia* representa un enorme y cosmopolita grupo de cerca de 1000 especies con un marcado rango de variación en cuanto a formas de crecimiento, biosíntesis de metabolitos secundarios y morfología floral (Walker & Sytsma, 2007). La expansión mundial de este género se centra especialmente en tres regiones: América del Sur y Central (500 especies), Asia central y el Mediterráneo (250 especies) y Asia del Este (100 especies) (Walker *et al.*, 2004). El género *Salvia* se encuentra separado de los otros miembros de la tribu *Menthae* en base a su inusual estructura estaminal.



Mientras que la mayoría de especies muestran cuatro estambres, el género *Salvia* presenta sólo dos, y las dos tecas de cada estambre están separadas por un conectivo (Walker *et al.*, 2004). Estos mismos autores, mediante reconstrucciones filogenéticas, suponen que el género *Salvia* no es monofilético y que comprende tres grupos con distinto origen evolutivo.

Imagen 2.- Estructura estaminal del género *Salvia*.

La palabra “salvia” deriva del latín “salvere”, que significa “salvar”. Ello puede dar una idea de que su uso como planta medicinal viene desde muy antiguo. Las especies del género *Salvia* son plantas que se caracterizan por sus propiedades farmacológicas y por la producción de aceites esenciales. Este género representa cerca de un cuarto de las especies de la familia *Lamiaceae* y es reconocido a nivel global debido a su importancia comercial, medicinal y cultural, formando parte, además, de las farmacopeas de numerosos países. Alrededor de 400 especies de este género son utilizadas en todo el mundo por la medicina tradicional o moderna, como plantas aromáticas o como ornamentales; entre ellas especies como *S. officinalis* L., *S. fruticosa*

Mill., *S. sclarea* L., *S. divinorum* Epling & Játiva, *S. pomifera* L., *S. miltiorrhiza* Bunge, *S. hispanica* L. o *S. lavandulifolia* Vahl., por citar algunas de las más representativas (Codd, 1985; Franz & Novak, 2010).

La especie de *Salvia* más cultivada a nivel nacional y europeo es *S. officinalis*, siendo, por lo tanto, la más implantada en el mercado. La salvia oficial, también conocida como salvia de jardín, es una planta originaria del Mediterráneo oriental y crece de manera natural en suelos calcáreos. Es, junto con *S. fruticosa*, la especie más importante comercialmente de las salvias mediterráneas, con una larga tradición como planta aromática y medicinal (Putievsky *et al.*, 1990). Esta especie es ampliamente cultivada en toda la cuenca Mediterránea y en Estados Unidos. Muchas de estas especies mediterráneas son especies muy próximas, en las que las hibridaciones son frecuentes, y en las que la identificación taxonómica debe ser seguida de análisis fitoquímico e incluso completarse con marcadores moleculares, para garantizar una correcta identificación tanto de las especies como de los productos o extractos que puedan derivar de ellas (Gnavi *et al.*, 2009).

Las especies de salvias mediterráneas que más atención han suscitado en cuanto a la investigación de sus propiedades biológicas son *S. officinalis*, *S. sclarea*, *S. pomifera*, *S. fruticosa*, *S. lavandulifolia*, *S. multicaules* Vahl., *S. hydrangea* DC. Ex Benth. y *S. verbenaca* L. De éstas, las especies más importantes en cuanto a su cultivo y comercialización son *S. officinalis*, *S. fruticosa*, *S. lavandulifolia* y *S. sclarea*.

### **1.2.1. Fitoquímica y aspectos farmacológicos del género *Salvia***

Los principales constituyentes fitoquímicos del género *Salvia* son los polifenoles (principalmente flavonoides) y los terpenos. Las partes aéreas de la planta normalmente contienen flavonoides y triterpenos, además de compuestos volátiles como los monoterpenos y sesquiterpenos que forman los aceites esenciales. Sin embargo, en las raíces, los principales compuestos son los derivados diterpénicos (Ulubelen, 2000).

La mayor parte de los triterpenoides descritos pertenecen a derivados del ácido ursólico y oleanólico, ambos presentes en *S. officinalis* y *S. lavandulifolia*, entre otras especies (Máthé *et al.*, 2010; Qiang *et al.*, 2011). Con respecto a los diterpenoides, los principales son los derivados del abietano, cloredano, pimarano y labdano (Ulubelen, 2000). De entre estos diterpenoides, ciertos derivados del abietano y pimarano han sido descritos en *S. lavandulifolia* (Michavila *et al.*, 1986; Guillén & Manzanos, 1999). Entre

los polifenoles, destacan por sus propiedades biológicas los ácidos clorogénico, rosmarínico, carnósico y caféico (Benno *et al.*, 2011, Gião *et al.*, 2012).

Las principales acciones farmacológicas de este género son, en general, debidas a tres grandes grupos de componentes: los polifenoles, los derivados diterpénicos y los terpenos que forman los aceites esenciales. Los flavonoides constituyen un importante grupo de polifenoles. Son numerosos los efectos beneficiosos para la salud descritos con referencia a estos compuestos, siendo los más relevantes la capacidad estrogénica, antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante (Das & Rosazza, 2006; Wang *et al.*, 2010; Gião *et al.*, 2012). De los derivados terpénicos (diterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos) se han descrito actividades antituberculosas (Ulubelen *et al.*, 1997), antiinflamatorias (Pferschy-Wenzig *et al.*, 2008), antiparasitarias y nematocidas (Fokialakis *et al.*, 2007; Samoylenko *et al.*, 2008) y antifúngicas e insecticidas (González-Coloma *et al.*, 2005; Kofujita *et al.*, 2006).

Las aplicaciones médicas de este género son muy diversas debido a las diferentes actividades farmacológicas que presentan las distintas especies. Brevemente, algunas de ellas son empleadas como antihelmínticas y antibacterianas (*S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. triloba* L.f., *S. fruticosa*), hipoglucemiantes (*S. lavandulifolia*, *S. fruticosa*, *S. triloba*), hepatoprotectoras (*S. miltiorrhiza*), estimulantes del apetito (*S. officinalis*, *S. lavandulifolia*), contra desórdenes menstruales (*S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. sclarea*) o expectorantes (*S. officinalis*, *S. triloba*) (Kintzios, 2000). Se emplean también, para la fitorremediación con el objetivo de eliminar compuestos tóxicos del suelo o del agua (Okuhata *et al.*, 2010). El amplio rango que forman todos estos efectos se pone de manifiesto a través de la diversidad de las especies que forman el género. Actualmente los efectos biológicos que más importancia e interés están suscitando desde el punto de vista de la investigación, con especies mediterráneas de *Salvia* son los siguientes:

- Efectos antioxidantes: los radicales libres atacan el ADN, el ARN, proteínas, y especialmente, ácidos grasos poliinsaturados de las membranas lipídicas. Éste ha sido, por tanto, uno de los efectos que mayor atención ha suscitado desde hace varias décadas. Se han descrito actividades antioxidantes en *S. fruticosa* (Exarchou *et al.*, 2002; Senol *et al.*, 2011), *S. officinalis* (Lima *et al.*, 2005, Krishnaiah *et al.*, 2011), *S. pomifera* (Couladis *et al.*, 2003), *S. hydrangea* (Asadi *et al.*, 2010) y *S. lavandulifolia* (Perry *et al.*, 2001 y 2003; Zupko *et al.*,

2001). El género *Salvia* es rico en componentes antioxidantes. De la especie *S. lavandulifolia*, Tomás-Lorente *et al.* (1988) aislaron en plantas de su subespecie *vellerea* 16 flavonoides, 4 glicóidos de las vacuolas y 12 agliconas libres en la superficie de la hoja, mientras que Zarzuelo *et al.* (1995) aislaron de *Salvia lavandulifolia* ssp. *oxyodon* el flavonoide luteolin-5-O- $\beta$ -rutinosido, de reconocido efecto médico en el tratamiento contra la diabetes *mellitus*. Otra vía de aprovechamiento de estas plantas es el campo de la alimentación animal, como medio de proveer a los piensos de antioxidantes endógenos y mejorar así las cualidades de los productos obtenidos. El objetivo fundamental es evitar una de las principales causas del deterioro de la carne, que es la oxidación lipídica, que conduce a una disminución del valor nutritivo y sensorial. En esta línea de trabajos, Grau *et al.* (2000) concluyen que la adición de antioxidantes de origen natural, entre ellos el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E, ha demostrado ejercer una relevante acción antioxidante en carne, tanto cruda como cocida, en condiciones de congelación o de refrigeración.

- Efectos antimutagénicos: los estudios bio-antimutagénicos para buscar antimutágenos naturales en las salvias empezaron a finales de los 80 con extractos de *S. officinalis* (Natake *et al.*, 1989). Gran parte de la capacidad antimutagénica que presentan especies como *S. officinalis*, *S. lavandulifolia* o *S. fruticosa* se debe a la capacidad de proteger al ADN del estrés oxidativo por parte de algunos compuestos polifenólicos y de los terpenos del aceite esencial (Vukovic-Gacic *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2008 y 2010).
- Efectos insecticidas, antifúngicos y antibacterianos: las actividades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales y de los extractos procedentes de plantas aromáticas y medicinales han sido los efectos más estudiados y ensayados. Existe una extensa literatura sobre las capacidades antimicrobianas del género *Salvia*, las cuales revelan una gran variabilidad en cuanto a la sensibilidad que presentan los microorganismos y la eficacia de los compuestos ensayados. En general, las especies más estudiadas son las que representan la mayor producción comercial de aceite esencial (*S. officinalis*, *S. triloba* y *S. fruticosa*) (Baricevic & Bartol, 2000). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales provenientes de éstas y otras especies está bien



documentada (Bakkali *et al.*, 2008). Toda esta variabilidad descrita en cuanto a la fitoquímica del género se encuentra asociada a una gran multifuncionalidad que trae como consecuencia que puedan interaccionar con múltiples dianas biológicas (Pavela, 2005; Kordali *et al.*, 2007; Bozin *et al.*, 2007; Isman *et al.*, 2011). Por ejemplo, muchos autores asocian la actividad insecticida de estas esencias a sus componentes mayoritarios: 1,8 cineol, alcanfor, linalol, limoneno, carvacrol, p-cimeno,  $\alpha$ -pineno (Kordali *et al.*, 2007; Badawy *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011). Sin embargo, dada la complejidad química de las esencias, en muchos casos, la actividad insecticida se ve reforzada por la interacción entre compuestos que actúan sinérgicamente (Isman *et al.*, 2011) y en otros casos de forma aditiva y/o antagonista (Pavela *et al.*, 2010).

- Dianas farmacológicas frente al mal de Alzheimer y referidas a la memoria: la creencia de que la salvia sirve para fortalecer la memoria viene desde la antigua Grecia. Las dos especies más estudiadas a este respecto son *S. officinalis* y *S. lavandulifolia*. Tanto los extractos etanólicos como los aceites esenciales de estas dos especies han demostrado una alta capacidad anticolinesterasa al inhibir las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (ambas dianas terapéuticas de la enfermedad de Alzheimer). La mayoría de fármacos aprobados para esta enfermedad van en esa dirección. La acetilcolina tiene una función importante en la capacidad cognitiva, incluidos en los procesos de memoria y atención. Por este motivo, *S. lavandulifolia* ha sido referida con efectos positivos sobre la memoria tanto en pacientes sanos como con demencia senil, en los que podrían estar implicados además la actividad antioxidante, estrogénica y antiinflamatoria (inhibición de la síntesis de eicosanoides) que muestran algunos componentes de sus aceites esenciales (Perry *et al.*, 2003; Kennedy & Wightman, 2011).

### I.3. LA SALVIA ESPAÑOLA (*Salvia lavandulifolia* Vahl.)

El encuadre sistemático de la especie *Salvia lavandulifolia* Vahl. (Morales, 2010) es el siguiente:

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

Tribu: *Menthae*

Género: *Salvia*

*Salvia lavandulifolia* Vahl. es una mata muy ramificada, por lo general de porte más o menos rastrero, aunque puede alcanzar hasta los 50 cm de altura. Los tallos son leñosos en la base con numerosas ramificaciones erectas y herbáceas. Las hojas son simples, pecioladas y de filotaxis opuesta. El peciolo, en muchos casos, es igual de largo que el limbo. Las nerviaciones forman un retículo muy marcado en el envés. La inflorescencia es larga, de hasta 50 cm, simple o ramificada, formada por verticilastros. El cáliz está fusionado en un tubo. La corola es de color azul claro o lila, de hasta 25 mm de longitud, gamopétala y abierta en dos labios en su parte distal: el superior tiene forma de casco y está formado por dos pétalos, mientras que el inferior lo forman los tres pétalos restantes. El androceo está soldado a la corola y formado por dos estambres, con dos tecas cada uno unidas por un conectivo, cuya particular morfología determina que los insectos, para acceder al fondo de la corola, donde se encuentra el néctar, hayan de empujar una especie de trampilla. De esta forma, los insectos han de entrar en contacto con las tecas fértiles, de manera que se favorece el proceso de polinización entomológica (Izco, 2004; Pérez-Galindo, 2005). Esta especie ocupa en la Península Ibérica zonas calizas a partir de una cierta altitud. Por lo tanto, su principal zona de distribución se centra en las montañas del centro y este peninsular, formando parte de los típicos matorrales mediterráneos de zonas calizas (figura 1). Es una planta rústica que soporta bien suelos con poca profundidad, calizos y pH superior a 8. Aunque su presencia se da desde las tierras bajas, prefiere zonas entre los 600-1000 metros de altitud (Burillo, 2003).

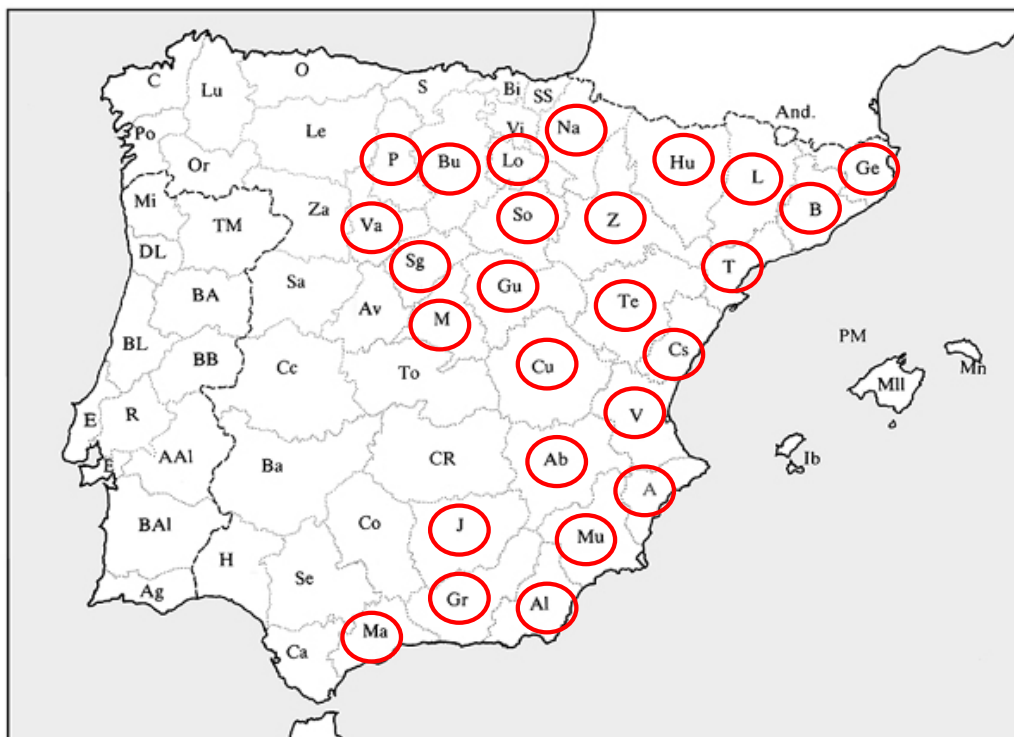


Figura 1.- Mapa de distribución de *Salvia lavandulifolia* en la Península Ibérica.

Fuente: <http://www.anthos.es>

El cultivo de PAM representa una importante actividad agraria en algunas zonas de España y, particularmente, en las comarcas castellano-manchegas de la Alcarria (Cuenca y Guadalajara), Serranía Alta (Cuenca) y Señorío de Molina-Alto Tajo (Guadalajara), donde se concentra el 50% de la producción nacional de lavandas (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010). Los cultivos de *Salvia*, aunque en menor medida, también forman parte de estos cultivos tradicionales de PAM.

A pesar de ser la salvia española una especie autóctona adaptada a las condiciones edafoclimáticas locales, su puesta en cultivo es complicada, principalmente por su porte rastrero (lo que dificulta su recolección mecanizada) y por no disponer los productores de un material vegetal adecuado y seleccionado (como es el caso de *S. officinalis*). Esto hace que muchas plantaciones partan de material vegetal proveniente de recolección silvestre (mediante la reproducción por semillas o vegetativamente por estaquillado de esquejes), lo que da lugar, en algunos casos, a plantaciones poco homogéneas en cuanto a la cantidad y calidad de las producciones (difícil trazabilidad). Esta especie se reproduce bien por estaquillado, mientras que su reproducción por medio de semillas es difícil debido a su bajo poder germinativo. Su cultivo puede ser

interesante para terrenos de secano, poco fértiles, calizos y con escasa pluviometría (es tolerante a la sequía). Además, es resistente a las bajas temperaturas invernales y poco susceptible al ataque de plagas y enfermedades.

Del cultivo de *S. lavandulifolia* se obtienen dos productos finales: o bien, las hojas secas, principalmente para herboristería, parafarmacia o alimentación, o bien, el aceite esencial, cuyo principal demandante es la industria farmacéutica y la industria cosmética. Los principales cultivos de salvia a nivel nacional y europeo corresponden, sin embargo, a *S. officinalis*. El cultivo de salvia española (*S. lavandulifolia*) es minoritario.

La salvia oficial (*S. officinalis*) se ha cultivado en España desde muy antiguo. Debido a ello, esta especie se ha naturalizado en muchos lugares. Sin embargo, es la salvia española (*S. lavandulifolia*) la que de forma espontánea se encuentra en España. Esta especie es muy variable y controvertida en cuanto a su clasificación en subespecies y razas. Es, por tanto, un taxón muy polimorfo del que se han descrito numerosos taxones infraespecíficos. Así, Morales (2010) diferencia 5 subespecies en base a pequeñas diferencias morfológicas, tales como la presencia o ausencia de tricomas en el cáliz, la menor o mayor abundancia de estas mismas formaciones en las hojas, etc. Estas subespecies son la subsp. *lavandulifolia*, subsp. *blancoana* (Webb & Heldr.) Rosua & Blanca, subsp. *oxyodon* (Webb & Heldr.) Rivas Goday & Rivas Mart., subsp. *vellerea* (Cuatr.) Rivas Goday & Rivas Mart. y subsp. *mariolensis* (Figuerola) Alcazar & Rivas Mart.

La principal característica química que diferencia las especies *S. officinalis* y *S. lavandulifolia* es la ausencia casi completa, en ésta última, de dos compuestos monoterpénicos ( $\alpha$ -tuyona y  $\beta$ -tuyona) que son potencialmente tóxicos por ser antagonistas de receptores GABA neuronales (Kennedy & Wightman, 2011). Estos dos compuestos pueden llegar a representar el 40-50% del aceite esencial de *Salvia officinalis*. Las tuyonas son valoradas por la industria de la perfumería y cosmética, sin embargo, en la producción con destino a la industria alimentaria y a la fitomedicina, sector éste último en auge debido a los recientes estudios clínicos que muestran las propiedades anti-degenerativas de las salvias, se observa una mayor preferencia por *S. lavandulifolia* (Perry *et al.*, 2003; Tildesley *et al.*, 2003).

### **I.3.1. Estudios previos**

La investigación llevada a cabo con esta especie se puede dividir, en cuanto a su orientación práctica, en estudios clínicos y en estudios fitoquímicos y quimiotaxonómicos.

#### **I.3.1.1. Estudios clínicos**

Desde que Perry *et al.* (2000) describieran la actividad anticolinesterasa *in-vitro* de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia*, ésta ha sido la línea de investigación que más atención ha suscitado en relación a la especie. Numerosos estudios se han llevado a cabo desde entonces para definir los compuestos (polifenoles y un amplio rango de monoterpenos) que presentan ésta y otras actividades biológicas de interés como son actividades antiinflamatorias, estrogénicas o antioxidantes, así como sus interacciones sinérgicas y antagonistas. Los últimos estudios van encaminados a demostrar la mejora en la capacidad cognitiva tanto en pacientes sanos como en pacientes con demencia senil y mal de Alzheimer que proporcionan algunos de los compuestos presentes en *S. lavandulifolia* (Perry *et al.*, 2001, 2002, 2003; Savelev *et al.*, 2003; Tildesley *et al.*, 2003; Savelev *et al.*, 2004; Tildesley *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2011).

#### **I.3.1.2. Estudios fitoquímicos y quimiotaxonómicos**

Desde otro punto de vista, esta especie ha sido estudiada con el objetivo de describir su apreciable variabilidad fitoquímica a nivel intraespecífico. Esta variabilidad ha sido descrita, principalmente, en referencia a los aceites esenciales. Así, Marcos *et al.* (1988) describen rendimientos y composición química de las diferentes subespecies de *S. lavandulifolia*. A nivel específico diversos autores han descrito la composición química tanto en cultivo como en poblaciones naturales. A modo de resumen, Giannouli & Kintzios (2000) agrupan todos los rangos descritos hasta la fecha para los componentes de los aceites esenciales de esta especie. Otros autores describen tanto la composición química de los aceites esenciales como otros compuestos no volátiles (flavonoides y diterpenos, fundamentalmente), ya sea en cultivo o en material vegetal recolectado de

poblaciones naturales de la Península Ibérica (Guillén & Ibargoitia, 1995; Zarzuelo *et al.*, 1995; Guillén *et al.*, 1996; Guillén & Manzanos, 1999).

Para conocer la variación fitoquímica que presenta esta especie en su distribución natural en la Península Ibérica, desde el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y en colaboración con diversas Comunidades Autónomas (entre ellas Castilla-La Mancha, a través del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito, en Cuenca) se están llevando a cabo desde el año 2000 diversos proyectos de investigación al respecto. Estos proyectos (RTA 2005-00168-C04-04, RTA 2009-00062-C03-01, PAI09-0011-7640 y PII10-0001) tienen como objetivo la elaboración de mapas de distribución silvestre de especies como el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), la salvia española (*Salvia lavandulifolia* Vahl.) y el espliego (*Lavandula latifolia* Medik.) en base a la riqueza en principios activos (aceites esenciales y polifenoles), además de iniciar trabajos de selección, mejora y respuesta agronómica de estas especies. En lo que respecta a *S. lavandulifolia*, nuestro grupo de investigación ha descrito la variabilidad química de esta especie en el centro peninsular en base a sus aceites esenciales (Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010), constatando una gran variación intraespecífica.

### **I.3.1.3. Otros estudios**

Esta especie también ha sido estudiada, junto con otras, para constatar los efectos de la vegetación arbustiva y restos vegetales en superficie sobre la pérdida de suelo, sobre la reducción de escorrentía y la protección de los agregados del suelo. Es decir, evaluar la eficacia en la protección de suelos con cierta pendiente de especies arbustivas como *Salvia lavandulifolia*, *Rosmarinus officinalis* y *Lavandula latifolia* (Bienes *et al.*, 2010). De las tres especies estudiadas, la salvia española es la que produce mayores efectos beneficiosos sobre las características del suelo, mejorando la capacidad de infiltración y aumentando la macroporosidad del suelo (resultados inéditos sin publicar del proyecto RTA2008-0047). Además, este trabajo tiene como objetivo estudiar la viabilidad económica de estos cultivos como alternativa en secanos marginales. El citado proyecto se ha llevado a cabo por el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) en colaboración con el Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca), a través de nuestro grupo de investigación.

#### I.4. LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles provenientes del metabolismo secundario de las plantas. Todas las especies vegetales poseen la capacidad de producir compuestos de naturaleza volátil, sin embargo, en la mayoría de los casos lo hacen en proporciones traza. Las denominadas “plantas aromáticas” son las especies que producen esencias que tienen algún tipo de interés comercial. Más del 90% de la producción de aceites esenciales se utiliza como materia prima en la industria de la cosmética (perfumes y productos para la piel y el cabello), alimentaria (aromatizantes), farmacéutica (antimicrobianos principalmente) y herboristería (aromaterapia) (Isman *et al.*, 2011; Lubbe & Verpoorte, 2011). Los aceites esenciales muestran un amplio rango de actividades biológicas y 31 de ellos tienen monografías específicas en la última edición de la Farmacopea Europea (2007). Alrededor de 3000 especies de plantas pertenecientes a 10 familias botánicas se utilizan para la obtención de aceites esenciales (Thripathi *et al.*, 2009). Sin embargo, sólo 300 de estos aceites se comercializan en el mercado mundial, clasificándose en 3 grupos de acuerdo a su volumen de producción (CBI, 2009). Entre las 20 especies de plantas aromáticas cuyos aceites esenciales tienen más demanda, se encuentra el lavandín (*Lavandula x intermedia*) ubicado dentro del grupo 1 (producción de más de 100 t/año). El espliego (*Lavandula latifolia* Medik.), la salvia común (*Salvia officinalis* L.), la salvia española (*Salvia lavandulifolia* Vahl) y el tomillo (*Thymus vulgaris* L.) están clasificados dentro del grupo 2 (producción entre 50-100 t/año) (Lubbe & Verpoorte, 2011).

Dos son las principales circunstancias que hacen que una planta sea considerada como aromática:

- Una combinación única de compuestos volátiles que dan un aroma característico. Éste es el caso, por ejemplo, de las especies de rosa (*Rosa* sp.), de jazmines (*Jasminum* sp.) o violetas (*Viola* sp.). Las flores de estas especies emiten compuestos volátiles directamente de la capa epidérmica de los pétalos (Bergougnot *et al.*, 2007). Por lo tanto, aunque el olor sea muy intenso, el rendimiento en producción es muy bajo y para la extracción de las fragancias se emplean métodos especiales como el método *enfleurage*.

- Que las especies secreten y acumulen los compuestos volátiles en estructuras anatómicas especializadas. Esto conduce a una mayor concentración de los aceites esenciales en la planta. Estas estructuras pueden ser idioblastos secretores (células secretoras), conductos o cavidades secretoras y glándulas de los tricomas (Svoboda *et al.*, 2000; Maffei, 2010).

Los idioblastos secretores son células individuales que producen aceite esencial y otras sustancias lipófilas en grandes cantidades y lo retienen en las vacuolas dentro de la misma célula. Éste es el caso de las raíces de *Vetiveria zizanoides* Nash. Similar es el caso de las fragancias de la mayoría de las flores, donde éstas pueden sintetizarse en células concretas o en áreas dispuestas en la epidermis de los pétalos (Franz & Novak, 2010).

Los conductos o cavidades secretoras son estructuras menos visibles, ya que se encuentran dentro de los tejidos de las plantas. Estos conductos consisten, básicamente, en grandes espacios extracelulares rodeados de un epitelio de células secretoras que excretan sus productos en la cavidad extracelular. Estos conductos están presentes en diversas familias como *Myrtaceae*, *Asteraceae*, *Rutaceae* o *Umbeliferae*, entre otras.

Por último, otras especies almacenan los compuestos volátiles sintetizados en estructuras especializadas denominadas tricomas glandulares. Estas glándulas liberan su contenido en respuesta a un daño en los tejidos. Estas estructuras están presentes en familias como *Lamiaceae*, *Asteraceae* o *Solanaceae*, entre otras. Los tricomas glandulares varían morfológicamente entre las distintas familias, aunque por lo general existen dos tipos de estructuras básicas. Las estructuras más sencillas son los denominados coléteres o pelos glandulares (“*capitate trichomes*”), formados por una célula basal, varias células pedunculares y una o varias células secretoras (de 1 a 4 células) que dejan un pequeño espacio subcuticular. Las glándulas más complejas son los denominados tricomas glandulares *sensu stricto* (“*peltate trichomes*”), formados por una célula basal de sostén, una o varias células pedunculares y varias células secretoras (de 4 a 16 células) en el ápice que dejan un gran espacio subcuticular donde se acumula el aceite esencial (imagen 3). La secreción se acumula bajo la cutícula de las células secretoras y se vierte cuando la cutícula se rompe (Maffei, 2010).



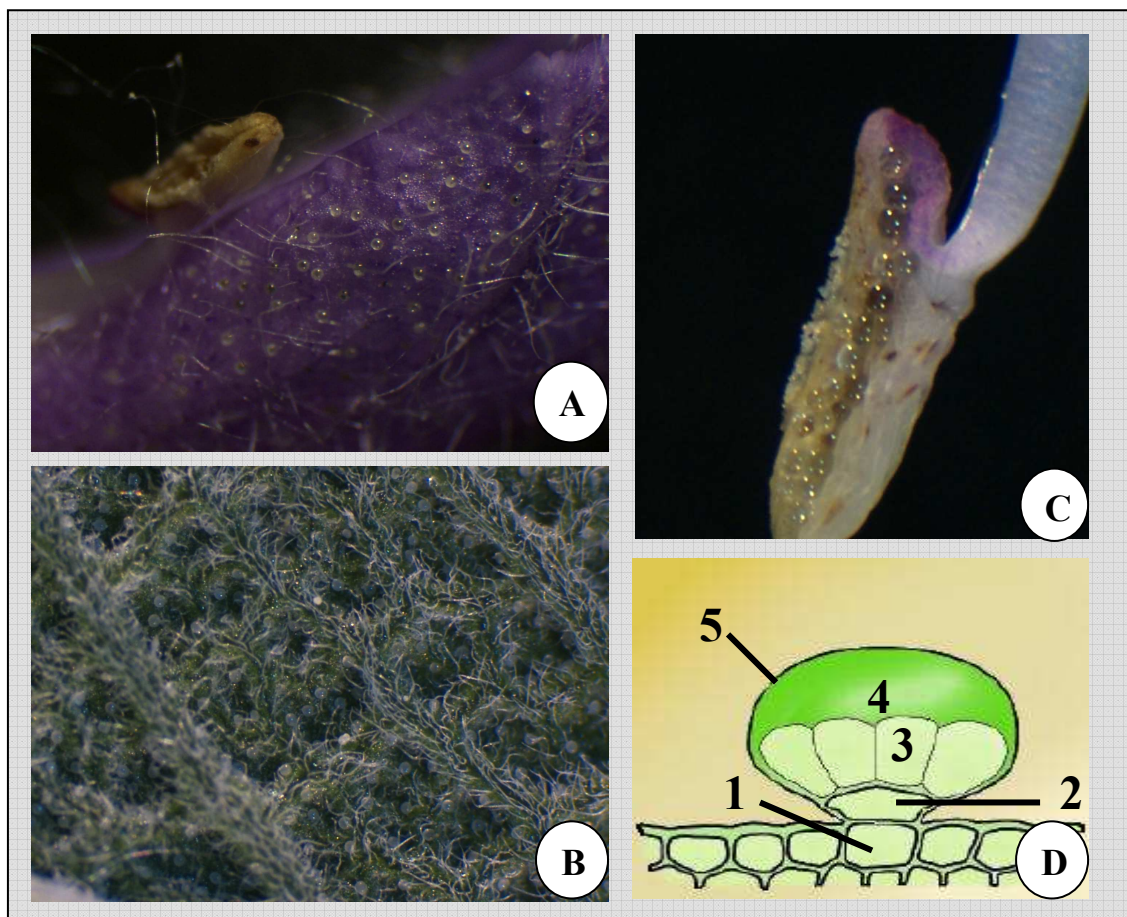


Imagen 3.- Estructuras de secreción de aceite esencial en distintas partes de *S. lavandulifolia*. (A) Pétalos. (B) Envés de la hoja. (C) Anteras. (D) Esquema tipo de un tricoma glandular. (1) Célula basal. (2) Célula peduncular. (3) Células secretoras. (4) Aceite esencial (terpenos acumulados). (5) Cutícula.

Los principales constituyentes de los aceites esenciales son los terpenos de bajo y medio peso molecular como los monoterpenos, los sesquiterpenos y, en menor medida, los diterpenos. Los terpenos tienen diversas funciones en el reino vegetal, especialmente de protección frente a infecciones, parásitos y otras situaciones de estrés, además de como antisépticos y atrayentes de insectos para la polinización (Bakkali *et al.*, 2008). Aunque los terpenos son los principales constituyentes de los aceites esenciales, en algunas especies aparecen también otros compuestos de naturaleza química distinta, como los fenilpropanoides. Los fenilpropanoides, cuando están presentes, aportan una distinción concreta en cuanto a los aromas. De hecho, la mayoría de las esencias son mezclas extremadamente complejas en su composición química por la presencia de una gran variedad de grupos funcionales diferentes. Estos grandes grupos químicos son la base para una posterior diversificación en una gran variedad de

esqueletos funcionales como son limoneno, myrceno, farneseno, eugenol, etc. Muchos de los constituyentes de los aceites esenciales se encuentran presentes sólo en trazas y no suelen ser citados cuando se expresa la composición química de una determinada esencia, a no ser que sean origen de alguna característica distintiva concreta de aceptación o desagrado.

Aunque se han llevado a cabo numerosos experimentos sobre la biosíntesis y la actividad biológica de los terpenos y otros metabolitos secundarios, la mayoría han estado enfocados hacia áreas como la industria o la medicina. Todavía, por tanto, se sabe muy poco sobre su papel en la naturaleza (Gershenzon & Dudareva, 2007). La mayoría de organismos producen una mezcla más o menos compleja de terpenoides, como es el caso de los aceites esenciales, en vez de uno solo o varios compuestos. A nivel molecular, esto es consecuencia de las rutas metabólicas que los producen. A nivel de organismo, esto puede suponer una mayor eficacia en la funcionalidad de los terpenos sintetizados mediante, por ejemplo, efectos sinérgicos. En este sentido, proporciona más información, en el caso de los aceites esenciales, el estudio de las esencias completas que algunos de sus componentes por separado (Bakkali *et al.*, 2008). Toda esta mezcla compleja de compuestos también da lugar a que exista una alta probabilidad de que un individuo concreto de una población exprese una composición química única.

La síntesis de los constituyentes de los aceites esenciales parece haber evolucionado con la aparición de las plantas terrestres. Las rutas metabólicas que conducen a la generación de los esqueletos (isopentenil pirofosfato) para la formación de los terpenos que constituyen los aceites esenciales coinciden con las que se desarrollan en las eubacterias (Sangwan *et al.*, 2001). Los terpenos y los fenilpropanoides se originan a través de rutas biosintéticas distintas. Los terpenos se sintetizan a partir de las 5 unidades de carbono del isopentenil pirofosfato (IPP), también denominado isopreno, siendo éste el precursor de las series de monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), etc. (Owen & Peñuelas, 2005) (figura 2). Estos grupos químicos serán los precursores de los principales esqueletos de las diversas clases de terpenos mediante reacciones de oxidación, reducción, isomerización, conjugación, etc.

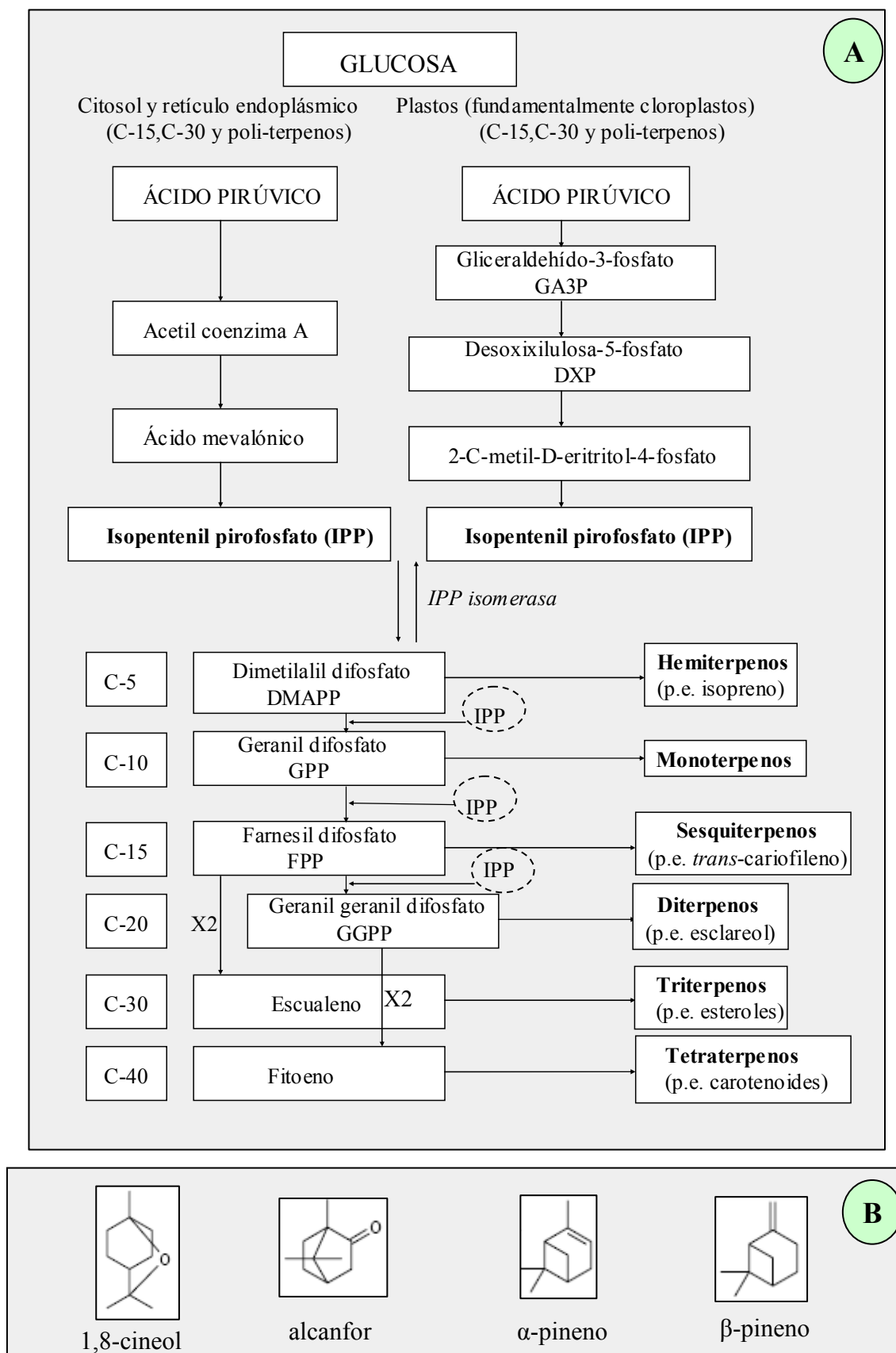


Figura 2.- Biosíntesis de terpenoides. (A) Ruta metabólica implicada en la síntesis de terpenoides. (B) Monoterpenos mayoritarios en el aceite esencial de *S. lavandulifolia*.

Esta serie en cascada de reacciones metabólicas proporciona la base para la enorme diversidad química de los aceites esenciales y otros productos naturales.

A la hora de conseguir una mayor producción y mejor calidad de los aceites esenciales, con cultivos más rentables bajo diversas condiciones agro-climáticas, las investigaciones deben ir encaminadas no sólo al desarrollo de mejores variedades, quimiotipos o ecotipos, sino a discernir la regulación fisiológica o el significado biológico de la producción de aceites esenciales (Sangwan *et al.*, 2001).

#### **I.4.1. Métodos extractivos, analíticos y de conservación**

El material vegetal recolectado del cultivo debe tener los cuidados necesarios para mantener la calidad del producto. El primero de ellos es no amontonarlo o depositarlo en un sitio cerrado, ya que podría entrar en fermentación y ello ocasionaría una pérdida rápida de principios activos y, en consecuencia, de calidad (materia seca o aceite esencial).

En la planificación de los cultivos destinados a la producción de “materia seca”, principalmente hojas, es necesario contar con instalaciones adecuadas para el secado. No es aconsejable que el material vegetal sobrepase los 35° C, ya que esto podría ocasionar una considerable pérdida de estos compuestos volátiles. Además, es conveniente eliminar la humedad de la planta siguiendo los índices de conservación indicados por el mercado, que en la mayoría de las especies se encuentra en el 10% de humedad (Burillo, 2003). Otro aspecto importante es que las hojas secas deben mantener su identidad y color característicos, por ser la parte más apreciada en la mayoría de las especies que se destinan actualmente a la fitoterapia, herboristería, dietética o alimentación. Cuando el producto final es el aceite esencial, se requiere un proceso posterior de extracción.

##### **I.4.1.1. Métodos extractivos**

Un número muy elevado de especies vegetales contienen compuestos volátiles que pueden ser extraídos y aislados como aceites esenciales. Según la “International Standard Organization” (I.S.O.), un aceite esencial se define como “un conjunto de productos volátiles que se obtienen de materiales naturales por destilación con agua o por corriente de vapor o, si se trata de frutos de cítricos, por un proceso mecánico de

extrusión, con un proceso posterior de separación de la fase acuosa”. Por lo tanto, productos obtenidos por otras técnicas como extracción con disolventes o extracción con fluidos supercríticos no son técnicamente considerados aceites esenciales (Baser, 1995). En base a las propiedades del material vegetal de trabajo, pueden emplearse los siguientes métodos extractivos para los compuestos orgánicos volátiles: destilación por arrastre en corriente de vapor, destilación por hidrodestilación, extracción con disolventes, extracción fraccionada con disolventes, maceración, métodos de prensado, *enfleurage*, extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquidos presurizados, extracción-destilación simultánea, extracción con Soxhlet o hidrodestilación asistida por microondas (MAHD), entre otros (Zellner *et al.*, 2010). Por otro lado, existen algunos métodos como son la evaporación de aromas asistida con disolventes (SAFE), la microextracción sólido-fase (SPME) o la desorción térmica directa (DTD), que se aplican directamente a la planta para analizar su composición volátil. En este apartado sólo se expondrán los métodos más empleados.

### **I.4.1.1.1. Procesos industriales**

La inmensa mayoría de los aceites esenciales son producidos bien a partir de material vegetal sometido a diferentes tipos de destilación, bien por prensado en frío, como es el caso de las esencias provenientes del epicarpo de los frutos de los cítricos.

En la destilación por arrastre en corriente de vapor, la fuente de materia vegetal se somete a una corriente de vapor de agua que arrastra a los componentes volátiles. El vapor de agua, junto con los compuestos volátiles arrastrados, es posteriormente condensado y recogido en un colector o vaso “florentino”, donde por diferencia de densidades se separan el aceite esencial y el agua condensada. Esta agua condensada puede ser desechada o retornar de nuevo al reactor donde se produce el vapor (Pybus & Sell, 1999). Esta destilación puede hacerse a presión atmosférica o con altas presiones. La aplicación de temperaturas más elevadas cuando se destila con altas presiones reduce sustancialmente el tiempo de destilación. Esta metodología es la más utilizada a gran escala (Kubeczka, 2010).

Los métodos de prensado en frío son aquéllos en los que las glándulas de esencia de la piel de los cítricos son mecánicamente sometidas a presión para liberar su contenido. El resultado de estos procesos es un producto que no es completamente volátil, sino que contiene cumarinas, pigmentos, etc; sin embargo, estos productos son

considerados como aceites esenciales por la “International Standard Organization” (I.S.O.) y las diferentes farmacopeas (Kubeczka, 2010).

La extracción con disolventes orgánicos se suele utilizar en especies cuyos aceites esenciales se degradan fácilmente por destilación o sobre plantas de las que interesa extraer distintos extractos a partir de una fuente inicial. El producto obtenido se denomina concreto o esencia concreta. Estos concretos poseen, normalmente, aromas más intensos que los destilados y pueden considerarse casi idénticos a la materia prima de la cual proceden. Por este motivo son muy utilizados en la industria perfumera y en la industria alimentaria, siempre que no queden residuos del disolvente empleado o éste haya sido autorizado para su uso en alimentación. Normalmente, los disolventes empleados son hexano, éter de petróleo o diclorometano. Esta metodología tiene el inconveniente de que en este tipo de extractos se pueden encontrar gran cantidad de sustancias lipófilas que obligan a posteriores purificaciones (Kumar & Motto, 1986; Kubeczka, 2010).

#### **I.4.1.1.2. Procesos a escala de laboratorio**

Estos procesos se utilizan fundamentalmente para trabajar a pequeña escala y para la determinación de la composición química de los aceites esenciales. El método más utilizado en los laboratorios es la hidrodestilación. Este método permite una rápida determinación cuantitativa de los aceites esenciales y, por ello, las diferentes farmacopeas han adoptado esta metodología. El diseño consiste en un matraz de fondo redondo donde se introduce el material vegetal y el agua. En este caso, el material a destilar está sumergido. Una vez que hierve el agua, el vapor arrastra los compuestos volátiles que, al pasar por un serpentín con refrigerante, condensan y se pueden separar por diferencia de densidades. Normalmente, el condensador vertical suele estar graduado para la medición del volumen de aceite esencial extraído. El tiempo de destilación depende del material vegetal, normalmente 3-4 horas. Para la determinación volumétrica de aceites esenciales, de acuerdo con la mayoría de las farmacopeas, debe ser añadida una pequeña cantidad de xileno (normalmente 0,5 mL) al agua de destilación antes de comenzar la ebullición. Con la adición de xileno se pueden separar hasta las más pequeñas gotas de aceite esencial durante la destilación (Kubeczka, 2010).

La extracción con fluidos supercríticos y la extracción mediante disolventes orgánicos (expuesta en el apartado anterior) también son técnicas de extracción que se pueden clasificar dentro de la escala de laboratorio.

La técnica empleada para el aislamiento de los aceites esenciales en esta Tesis doctoral fue la hidrodestilación. Además, en uno de los estudios se extrajeron esencias concretas mediante el proceso de extracción con disolventes orgánicos. Por ello, la metodología detallada de estas dos técnicas será expuesta en los apartados correspondientes.

### **I.4.1.2. Métodos analíticos**

Los métodos empleados en la caracterización química de los aceites esenciales se basan en las características físico-químicas que presentan. La mayoría de los métodos aplicados para el análisis de aceites esenciales radican en técnicas cromatográficas que permiten una separación e identificación de los compuestos que los forman. Sin embargo, son necesarias pruebas confirmatorias para una identificación fiable, evitando caracterizaciones tentativas o equívocas. Estas técnicas adicionales son la espectrometría y espectroscopía.

El principal objetivo de cualquier técnica de separación cromatográfica es la completa resolución de la muestra problema en el menor tiempo posible. Para llevar a cabo esta tarea, la cromatografía más adecuada para el análisis de los aceites esenciales es la cromatografía de gases (GC). En esta técnica, los compuestos analizados son evaporados y arrastrados por una fase móvil, el gas portador, a través de una columna capilar. Los compuestos son separados en base a sus presiones de vapor relativas y a su afinidad por la fase estacionaria. Al final de la columna capilar, los compuestos eluyen separados en el tiempo. Los compuestos individuales son entonces detectados dando lugar cada uno de ellos a una señal en forma de pico (idealmente gaussiano). El conjunto de estos picos para los distintos componentes de la muestra constituye el cromatograma, que enfrenta la intensidad de pico frente al tiempo de elución del compuesto. El área cada señal está directamente relacionada con la cantidad de muestra presente, mientras que el tiempo de retención está relacionado únicamente con la identidad química del compuesto. Por este motivo, la información que contiene un cromatograma puede interpretarse desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo. Para una aproximación más completa a la cromatografía de gases, se puede consultar la

siguiente bibliografía específica (Fowlis, 1995; Jennings, 1997; Mondello *et al.*, 2002; Barry & Grob, 2007). Además, existe bibliografía específica aplicada a los aceites esenciales (Kubeczka & Formáček, 2002; Adams, 2007; Herrmann, 2010; Zellner *et al.*, 2010).

#### **I.4.1.3. Conservación del aceite esencial**

Para una óptima conservación del aceite esencial es importante que no reciba luz natural directa y que el recipiente utilizado para su conservación esté completamente lleno y herméticamente cerrado. El aire en el interior del recipiente puede ocasionar la alteración de algunos principios activos con la consiguiente pérdida de calidad. Los recipientes más adecuados son los de vidrio de color topacio, aunque para el transporte a gran escala se utilizan recipientes metálicos con el interior vitrificado. Para su conservación y almacenamiento en frigorífico se deben mantener sin humedad y a una temperatura entre 0-4° C.

#### **I.4.2. Situación actual del mercado de los aceites esenciales**

La comercialización de aceites esenciales a nivel mundial se ha visto incrementada en los últimos años. Actualmente, son producidas cerca de 200.000 toneladas, con un valor de mercado aproximado de unos 2.500 millones de dólares. Las 12 esencias más importantes (con una producción superior a 1.000 toneladas) representan el 95% del aceite esencial producido en todo el mundo. Dentro de éstas se encuentran las esencias de lavandín (*Lavandula x intermedia*), y destacan por el volumen producido las de los cítricos (naranjas y limones) y las que provienen de la destilación de las mentas (*Mentha* spp.) (CPPARM, 2010). En cuanto al valor de las esencias, únicamente 18 aceites esenciales representan casi el 75% del total del valor. Ello es debido a que existe un comercio de pequeños volúmenes de esencias con alto valor unitario (€/kg de producto) como las que provienen de la rosa mosqueta (*Rosa moschata* Herrm.) o del jazmín (*Jasminum sambac* L.). Los principales países exportadores de aceites esenciales son EEUU, India y Francia. Sin embargo, los países con mayores valores unitarios en los aceites esenciales son Bulgaria, Francia y Suiza. (FAOSTAT, 2010). Casi el 90% del consumo mundial de aceites esenciales y absolutos o esencias concretas se produce únicamente en 13 países, liderados por EEUU y China,



que acaparan juntos el 44% del consumo mundial. La estimación para España es del 2% del consumo mundial (Shrinivas & Kudli, 2008).

El mercado principal de los aceites esenciales está dirigido a perfumería y fragancias, cuidados de la piel, cuidados del pelo y aromaterapia. La industria cosmética está cada vez más interesada en aceites esenciales específicos, muchos de ellos de origen tropical. La situación de la demanda exacta, por lo tanto, es difícil de caracterizar. Aunque, en general, la demanda de aceites esenciales es cada vez mayor, su utilización en las formulaciones es limitada. Esto puede explicarse por su limitada disponibilidad, costos más altos y restricciones legales. Por lo tanto, el desarrollo de alternativas sintéticas, que han traído consigo mejoras en el rendimiento y una reducción de los costes, continuará ejerciendo presión sobre los aceites esenciales, especialmente en el sector industrial de las fragancias, el cual es altamente competitivo e impulsor en la utilización de los sintéticos.

En relación al mercado español de aceites esenciales, las importaciones juegan un papel importante aunque, en general, se puede afirmar que éstas están equilibradas con las exportaciones. El sector mayorista es el que absorbe la mayor cantidad, con un 65 % de volumen de aceites esenciales, seguido por la industria alimentaria con un 20% y las industrias farmacéuticas y dietéticas con un 15%. En cuanto a las cantidades importadas y exportadas, destacan los aceites esenciales de lavanda, lavandín y romero, así como los bioproductos terpénicos, seguidos de los aceites esenciales de naranja (COMTRADE, 2010).

En cuanto a los precios, es muy difícil señalar la evolución general de precios debido al gran número de aceites esenciales comercializados en el mercado. Sin embargo, se puede decir que el nivel de los precios de los aceites esenciales está influenciado por, en primer lugar, factores de calidad que a su vez están determinados por influencia de factores genéticos propios de las plantas, factores ambientales relacionados con el cultivo (climatología, fitopatologías, etc) y, factores culturales relacionados con la cosecha y el método de extracción. En segundo lugar, los precios también están influenciados por factores económicos en base a la oferta y la demanda. La oferta depende del tamaño y los rendimientos de las cosechas actuales, de los stocks de los comerciantes, de los procesados y de los usuarios finales y, finalmente, de la existencia de sustitutos sintéticos.

### I.4.3. Los aceites esenciales de la salvia española y su normativa

La salvia española se caracteriza por una gran variabilidad en cuanto al rendimiento y composición química de sus aceites esenciales. Esta especie biosintetiza y almacena los aceites esenciales por medio de tricomas glandulares. En *S. lavandulifolia* aparecen los dos tipos morfológicos de tricomas glandulares, aunque la gran mayoría del aceite esencial está producido por los tricomas glandulares *sensu stricto* (“*peltate oil glands*”). Estas glándulas comprenden, básicamente, una célula basal epitelial, una pequeña célula en forma de conducto y una cabeza secretora multicelular formada por 4 células centrales y entre 8-12 células periféricas (Schmiderer *et al.*, 2008). Estas estructuras producen y almacenan la gran mayoría del aceite esencial y están distribuidas por toda la superficie de las partes aéreas de la planta. La cabeza secretora es la parte más aparente de toda la estructura y se puede apreciar al microscopio óptico en la superficie de las partes aéreas de la planta. Los coléteres o pelos glandulares “*capitate glandular harris*” son menos aparentes. Consisten en una célula basal, una o dos células en forma de conducto y una cabeza secretora unicelular. Aunque también están distribuidos por toda la superficie de las partes aéreas de la planta, sintetizan sólo una parte muy pequeña de todo el aceite esencial.

Debido a que la especie mayoritariamente cultivada y, por lo tanto, estudiada es *S. officinalis*, existen pocas referencias en cuanto al rendimiento que ofrece la salvia española en producción de aceite esencial. Destacar que estas referencias ofrecen una gran variabilidad de datos. Marcos *et al.* (1988) en su descripción de las diferentes subespecies presenta unos rangos que van desde el 0,4 % v/p hasta valores cercanos al 3% v/p. Crespo *et al.* (1986) describe los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* subespecie *oxyodon*, dando un valor medio de rendimiento del 1,5% v/p. Por otro lado, están descritos valores de 2,5% v/p (Guillén & Manzanos, 1999) y otros del 1% v/p (Guillén *et al.*, 1996), si bien el material vegetal de partida no se encontraba en el mismo estado fenológico. Coincidentes con los valores anteriores, Leung & Foster (1996) otorgan valores entre 1,0-2,8% v/p para el contenido en compuestos volátiles.

En cuanto a la composición química, existen grandes diferencias cuantitativas en relación al porcentaje relativo que representan los diferentes compuestos en el total del aceite esencial aislado. En general, se puede afirmar que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* está caracterizado por los compuestos  $\alpha$ -pineno (5-20%),  $\beta$ -pineno (2-27%), sabineno (8-19%), mirceno (<1-16%), limoneno (2-12%), 1,8-cineol (6-59%),

alcanfor (1-16%) y, además, una serie de sesquiterpenos con una proporción alrededor del 5% o superior (Lawrence, 1990). Las diferencias cualitativas en cuanto a los compuestos identificados existen, pero son de menor magnitud.

La tabla 2 muestra, a modo de resumen, una recopilación bibliográfica completa de los rangos encontrados en la mayoría de los compuestos identificados de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* (Giannouli & Kintzios, 2000).

Tabla 2.- Rango en la composición química (%) de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia*

Compuestos	% en la esencia	Compuestos	% en la esencia
$\alpha$ -pineno	1,93-24,00	$\delta$ -cadineno	0,01-2,80
canfeno	0,60-14,30	óxido de cariofileno	0,10-3,80
mirreno	0,50-15,60	$\beta$ -pineno	2,23-48,40
limoneno	0,78-58,40	manool	1,94-3,57
1,8-cineol	1,20-54,00	sabineno	0,07-5,80
(Z)- $\beta$ -ocimeno	0,20-2,50	$\alpha$ -felandreno	0,01-5,00
(E)- $\beta$ -ocimeno	0,05-1,30	alcanfor	1,30-36,10
terpinoleno	0,01-0,80	acetato de $\alpha$ -terpenilo	0,10-11,20
linalol	0,10-35,00	$\gamma$ -terpineno	0,05-1,30
acetato de linalilo	0,01-6,00	<i>p</i> -cimeno	0,01-4,60
acetato de bornilo	0,21-7,70	isoborneol	0,10-1,90
$\beta$ -cariofileno	0,20-12,80	$\alpha$ -cubebeno	0,05-1,10
terpinen-4-ol	0,10-2,50	biciclogermacreno	0,01-1,50
$\alpha$ -tuyeno	0,01-0,70	tricicleno	0,06-0,50
acetato de isobornilo	0,70-4,90	$\alpha$ -humuleno	0,10-6,20
$\alpha$ -gurjuneno	0,20-0,30	borneol	0,10-10,00
<i>ar</i> -curcumeno	0,10-0,90	acetato de sabinilo	1,80-6,20
$\alpha$ -tuyona	1,30-22,82	<i>allo</i> -aromadendreno	0,05-0,40
<i>cis</i> -acetato de sabinilo	0,01-24,00	viridiflorol	0,01-10,92
sabinol	0,10-2,50	$\beta$ -tuyona	0,01-22,82
$\alpha$ -terpineol	0,10-4,00	<i>cis</i> -sabinol	8,80-19,95

Destacar de esta recopilación bibliográfica el límite superior para los compuestos  $\alpha$ -tuyona y  $\beta$ -tuyona. Dichos compuestos, como se mencionó anteriormente, están ausentes de manera total o sólo aparecen en proporciones traza en el aceite esencial de *S. lavandulifolia*. Ello da lugar a pensar que la descripción de esos

porcentajes relativos proviene de una mala identificación de la materia prima. Los citados Marcos *et al.* (1988) y Crespo *et al.* (1986) determinan los rangos en que aparecen los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de las distintas subespecies de *S. lavandulifolia*. La subespecie *oxyodon* destaca por su alto contenido en alcanfor (~26%), que si bien también ha sido descrito en algunas poblaciones de las subespecies *lavandulifolia* y *vellerea* con porcentajes similares, lo normal es encontrarlo en porcentajes más bajos. Las subespecies *lavandulifolia* y *vellerea* se caracterizan por su elevado contenido en 1,8-cineol (hasta el 60%) y el de sabinol y acetato de sabinilo, respectivamente. La última subespecie citada por estos autores, *blancoana*, se caracteriza por su elevado contenido en  $\beta$ -pineno.

Existe normativa específica en cuanto a la calidad de los aceites esenciales. Además, estas normativas hacen referencia a directrices generales en cuanto a la toma de muestras, utilización de perfiles cromatográficos o reglas generales para el envasado, acondicionamiento y almacenamiento. Varios aceites esenciales de especies cultivadas en España tienen normativa desarrollada a nivel nacional: algunos ejemplos son el aceite esencial de orégano español o tomillo carrasqueño (*Thymbra capitata* (L.) Cav.) (UNE 84304:2006), aceite esencial de mejorana de España (*Thymus mastichina* L.) (UNE 84308:2008), aceite esencial de hinojo amargo (*Foeniculum vulgare* Miller ssp. *vulgare* Miller var. *amara*) (UNE 84311:2002) o aceite esencial de salvia española (*Salvia lavandulifolia* Vahl.) (UNE 84310: 2001). La normativa dedicada a la calidad del aceite esencial de la salvia española consiste en la exposición de un perfil cromatográfico para 11 compuestos que es normativo (tabla 3).

Esta norma tiene por objeto fijar ciertas características del aceite esencial, con objeto de la evaluación de su calidad. Dicha norma, a su vez, está relacionada con otras normas de carácter general para todos los aceites esenciales (números 1-6, tabla 3). La correspondiente normativa internacional sobre la calidad de este aceite esencial está desarrollada en la norma ISO 3526: 2005. Destacar que, así como el contenido en terpenos de los aceites esenciales de salvia está regulado mediante normativa, no existe regulación ni contenido mínimo para los polifenoles ni en la monografía de la Farmacopea Europea ni en la normativa ISO (Benno *et al.*, 2011).

Tabla 3.- Normativa para la composición química del aceite esencial de salvia de España (*Salvia lavandulifolia* Vahl.)

NORMA ESPAÑOLA UNE 84310/2001(diciembre) (reproducción parcial)			
Título: Aceite esencial de salvia de España ( <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.)			
Componentes	Mínimo %	Máximo %	
$\alpha$ -pineno	4	11	
sabineno	0,1	3	
limoneno	2	5	
1,8-cineol	11	30	
linalol	0,3	4	
alcanfor	15	36	
borneol	1	5	
terpinen-4-ol	-	< 2	
acetato de linalilo	0,1	5	
acetato de $\alpha$ -terpenilo	0,5	9	
acetato de sabinilo	0,5	9	
1. Toma de muestras. UNE 84150	2. Métodos de ensayo y preparación. UNE 84152		
3. Determinación índice de acidez. UNE 84157	4. Determinación del poder rotatorio. UNE 84159		
5. Determinación del punto de inflamación. UNE 175	6. Acondicionamientos, etiquetado y almacenamiento. UNE IN 84314 y 84315		

Los principales compuestos que forman parte del aceite esencial de *S. lavandulifolia* son 1,8-cineol, alcanfor,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno (figura 2, B). Este último compuesto, aunque no aparece referenciado en la normativa, es ampliamente citado como uno de los mayoritarios en el aceite esencial (Schmiderer *et al.*, 2008; Rzepa *et al.*, 2009; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010).

El compuesto 1,8-cineol es un éter monoterpénico cíclico también conocido como eucaliptol, debido a las altas concentraciones en las que se encuentra en el aceite esencial de *Eucalyptus polybractea* R.T.Braker (Jäger, 2010). Es ampliamente utilizado en cosmética, tratamientos para la tos, dolor muscular, reumatismo, asma y cálculos renales (Wichtel, 2002). Los aceites esenciales con alto contenido en 1,8-cineol son un potente inhibidor de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) (Savelev *et al.*, 2003), además de haber sido demostrada su eficacia en la mejora de la atención, memoria y

capacidad de reacción, tanto en pacientes sanos como con demencia senil y mal de Alzheimer (Kennedy & Wightman, 2011).

Otro constituyente, el alcanfor, es un monoterpeno bicíclico extraído de la madera del árbol *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl., que crece en el Sudeste de Asia y en América del Norte. Las formas sólidas de alcanfor forman cristales blandos de color blanco con intenso olor que se utilizan comercialmente como repelente de insectos y conservante en farmacia y cosmética (Wichtel, 2002). Este compuesto tiene efectos pro-oxidantes a altas concentraciones en las esencias (Savelev *et al.*, 2003).

Por último,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno son dos estructuras isoméricas, cuyos nombres sugieren que son importantes constituyentes de las resinas de los pinos. Concretamente,  $\alpha$ -pineno es más común en los pinos de Europa y  $\beta$ -pineno está más presente en los pinos de América del Norte (Jäger, 2010). En la industria, ambos compuestos se usan en la producción de bebidas alcohólicas como la ginebra (Wichtel, 2002). Importante destacar que  $\alpha$ -pineno ha demostrado una gran actividad antiinflamatoria (inhibición de la síntesis de eicosanoides) (Perry *et al.*, 2001).

Para finalizar este apartado, referenciar que el precio del aceite esencial de salvia española percibido por los productores consultados oscila entre los 38-40 €/kg en producción convencional y los 45 €/kg en producción ecológica. Otro posible formato de venta para la especie es el de sus hojas secas (sin destilar), destinadas principalmente al consumo alimenticio (como infusión), siendo en este caso el precio percibido de 15 €/kg. (consulta personal realizada entre productores durante el año 2011).

#### **I.4.4. Factores ambientales que afectan a la producción y composición química de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales, como compuestos provenientes del metabolismo secundario, están sujetos a cambios en su producción en función de las necesidades de la planta. Estos productos secundarios juegan un importante papel de adaptación de las plantas al ambiente, mejorando la eficacia de las interacciones con el ecosistema (Bourgaud *et al.*, 2001).

El principal factor a tener en cuenta cuando se utiliza material vegetal como fuente de aceites esenciales, es su gran heterogeneidad (Franz & Novak, 2010). Como la calidad de una planta aromática o medicinal está definida por su contenido en metabolitos secundarios y su rendimiento en biomasa, es necesario llegar a una

composición química reproducible e inequívoca. Ante la demanda creciente de materias primas de plantas aromáticas y medicinales, el mercado necesita material vegetal homogéneo, de calidad conocida y con una periodicidad de suministro establecida. Para ello es necesario conocer los factores que determinan la producción de estos metabolitos secundarios en las especies de interés para el cultivo.

Un primer prerequisite obvio para alcanzar el objetivo de conseguir uniformidad en la materia prima es la correcta identificación botánica. La identificación botánica clásica basada en macro- y microcaracteres morfológicos puede complementarse con análisis fitoquímicos. Además, estos análisis fitoquímicos pueden determinar la calidad de los aceites esenciales. Por otro lado, se pueden emplear técnicas complementarias de identificación basadas en marcadores moleculares.

La información genética del material vegetal, el estado fenológico de la planta, las condiciones de crecimiento o cultivo (temperatura, pluviometría, fertilización, altitud, radiación, horas de luz y tipo de suelo) (Barra, 2009; Figueiredo *et al.*, 2008), las de transformación y manipulación posterior, y el almacenamiento, son el conjunto de factores que influirán en la calidad final del material vegetal. La manera en que todos estos factores afectan a la calidad y la cantidad de planta producida depende básicamente de la especie, de la parte de la planta en la cual el principio activo se acumula y de las rutas metabólicas implicadas en la producción de los compuestos de interés.

Los trabajos de prospección y caracterización química de poblaciones silvestres han proporcionado y proporcionan una indispensable información de partida para el desarrollo de programas de selección y mejora de estas especies que permitan obtener en un futuro cultivares adaptados. Sin embargo, determinar la manera en que los factores abióticos y agronómicos afectan a la calidad y cantidad de la planta producida en cultivo es una labor necesaria de continuación de estos trabajos de caracterización y selección de quimiotipos provenientes de poblaciones naturales.

Son numerosos los estudios que demuestran el gran polimorfismo químico en las poblaciones naturales de la mayoría de las especies catalogadas como aromáticas y/o medicinales. En este sentido, el polimorfismo químico que presentan los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* Vahl. se encuentra descrito por Giannouli & Kintzios (2000), aunque el conocimiento fitoquímico de las poblaciones naturales de la Península Ibérica es todavía escaso. Estos polimorfismos frecuentemente se encuentran también cuando se comparan aceites esenciales de plantas individuales. Estas

diferencias son debidas a la genética individual del vegetal y son las que podrán determinar con certeza los quimiotipos.

Sin embargo, las diferencias observadas en las mezclas químicas complejas que son los aceites esenciales suelen ser difíciles de asignar a muestras provenientes de quimiotipos concretos o a diferencias como consecuencia de procesos de adaptación de las plantas a cambios ambientales, por ejemplo, diferentes localidades de origen. No obstante, los cambios en la composición química debido a diferencias genéticas suelen ser mayores que los cambios debido a la influencia de las condiciones ambientales (Franz & Novak, 2010).

Existen numerosos estudios que intentan determinar cómo afectan los factores ambientales al metabolismo secundario de las plantas y cómo éstas responden a la distribución del carbono ante el estrés generado. Cuando los recursos están disponibles, la planta distribuye el carbono principalmente para crecer, pero cuando un recurso específico como por ejemplo, el nitrógeno o el agua, limita el crecimiento, la planta tiende a acumular otros recursos, como el carbono, y los puede derivar para incrementar la síntesis de metabolitos secundarios (Bryant *et al.*, 1983; Herms & Mattson, 1992).

Conocer cómo afectan todos estos factores a la calidad de la planta, es imprescindible para poder iniciar un proceso de selección y mejora, con el objetivo de obtener nuevas variedades de las especies con las que se trabaja, y también es un prerequisite básico para ubicar una especie en un lugar determinado, ponerla en cultivo y establecer el manejo de producción más adecuado para obtener un producto final comercial, con la concentración de principios activos establecida por la farmacopea de cada país.

El cultivo de PAM en España ha adolecido desde sus inicios de la necesaria selección y domesticación de plantas autóctonas, que posibiliten la homogeneidad de las producciones tanto en cantidad como en calidad, motivo por el cual no se han llegado a conseguir plantaciones comerciales o industriales importantes. Para conseguir la viabilidad del sector, se debe proceder a realizar labores imprescindibles como son la selección de material vegetal y de procesos de domesticación, a la vez que se optimizan las técnicas de cultivo y se determinan la fijación de caracteres. Actualmente, la falta de datos de rendimiento y calidad de las plantas a lo largo de su ciclo productivo (son especies plurianuales con ciclos de 5, 6 o más años), conjuntamente con el desconocimiento de las prácticas culturales y su incidencia en la calidad, son aspectos



que limitan la consolidación de estas especies como alternativa de cultivos no alimentarios.

En las últimas décadas, la quimiotaxonomía ha sido ampliamente utilizada para clasificar las plantas intraespecíficamente en polimorfismos. La composición química de los aceites esenciales ha jugado un papel importante para este fin. El polimorfismo en las plantas aromáticas es, por tanto, un fenómeno ampliamente descrito. En este sentido, es necesario investigar sobre las poblaciones y sobre individuos concretos para conocer las variaciones intraespecíficas de las especies. Los aceites esenciales son el producto final de un complejo proceso biológico, y un prerequisite para mejorar la productividad en cultivo es el conocimiento de los factores que influyen en su cantidad y calidad (Franz & Novak, 2010). Los más importantes son los siguientes:

- Los polimorfismos químicos intraespecíficos, y derivados de estos, la herencia y biosíntesis de estas características químicas y como consecuencia la selección y mejora de nuevas variedades.
- La variación individual entre las distintas partes de una planta y del estado de desarrollo (“variación morfo-ontogenética”).
- Las modificaciones debido al ambiente bio-edafo-climático.
- Influencias humanas por las condiciones de cultivo, como por ejemplo, fertilización, irrigación o manejo de plagas.

En cuanto a la influencia que tienen los factores ambientales (bióticos y abióticos) en el metabolismo secundario de las plantas y, por lo tanto, en gran parte en la producción de aceites esenciales, son numerosos los estudios realizados al respecto. La acumulación en las plantas de metabolitos secundarios es, generalmente, un mecanismo de defensa (Wink, 2003; Maffei, 2010) y juega un papel principal en la adaptación de las plantas a variaciones ambientales (Edreva *et al.*, 2008), por lo que las situaciones de estrés normalmente favorecen la producción de estos compuestos. No obstante, debido a los múltiples mecanismos bioquímicos implicados en el papel protector de los metabolitos secundarios (Edreva *et al.*, 2008), no se debe generalizar, ya que la respuesta es, en muchos casos, función de la especie y del estado fenológico de la planta. Las plantas responden ante los ataques de los herbívoros mediante la emisión de ciertos compuestos orgánicos volátiles que avisan de la presencia de

herbívoros o parásitos y que sirven como un mecanismo de defensa indirecto (Heil *et al.*, 2008). Además, esta liberación de compuestos volátiles por las hojas, flores y frutos a la atmósfera o por las raíces al suelo, puede defender a la planta frente a nuevos herbívoros o patógenos, además de proporcionar ventajas en la reproducción debido a la atracción de polinizadores (Chen, 2008). En cualquier caso, la estimulación en las plantas para la producción y acumulación de estos compuestos puede ser desencadenada por factores de estrés de tipo biótico o abiótico (Arimura *et al.*, 2009).

El estrés abiótico, como cambios en la temperatura o el estrés hídrico, puede provocar cambios en la emisión y acumulación de compuestos orgánicos volátiles en las plantas. Algunos compuestos derivados del isopreno pueden estabilizar las membranas de los tilacoides o, debido a sus propiedades antioxidantes, incrementar la tolerancia a situaciones de estrés (Maffei, 2010). Además, el isopreno parece actuar en las membranas fotosintéticas como protector frente al daño por altas temperaturas (Sharkey *et al.*, 2001). Los aceites esenciales son sintetizados, almacenados y liberados al ambiente por una gran variedad de estructuras epidérmicas, cuya morfología es característica de cada grupo taxonómico. En el caso de las glándulas de los tricomas, la morfología varía con las especies e incluso dentro de una misma hoja puede haber varios tipos distintos de glándulas. El número y el tipo de estas glándulas condicionan también la producción de aceite esencial.

Ha sido descrita la influencia en la composición química de los aceites esenciales que tienen parámetros ambientales como la temperatura o el nivel de precipitaciones (Sangwan *et al.*, 2001). Las esencias extraídas, por tanto, pueden variar en calidad y cantidad de acuerdo con las condiciones climáticas, la composición del suelo, el órgano de la planta, la edad o el estado del ciclo vegetativo en que se encuentren en el momento de la recolección (Masotti *et al.*, 2003; Angioni *et al.*, 2006). Uno de los principales factores ambientales que afecta los procesos fisiológicos de las plantas, especialmente la fotosíntesis y el crecimiento, es la temperatura (Zobayed *et al.*, 2005). Cambios fisiológicos inducidos por estrés debido a cambios de temperatura pueden promover la producción de metabolitos secundarios.

La disponibilidad de agua y las condiciones de estrés hídrico son, a menudo, objeto de estudio con resultados contrapuestos. La cantidad de aceite esencial producido ante situaciones de estrés hídrico se puede mantener o incrementar, dependiendo de la especie o la magnitud del estrés (Sangwan *et al.*, 2001). En general, bajo un estrés hídrico moderado, las plantas acumulan carbono debido a la restricción del crecimiento

por la limitación de agua. Se supone que este carbono está dirigido a la síntesis de compuestos de defensa como los monoterpenos (Llusiá & Peñuelas, 2000). En *Hypericum brasiliense* Choisy (Nacif *et al.*, 2005), el déficit de agua incrementa la concentración de compuestos fenólicos (quercetina y rutina) y reduce el crecimiento en biomasa. En *Thymus vulgaris* L. (Piccaglia, 1998) estas mismas condiciones de déficit hídrico maximizan la concentración de timol y carvacrol, y en *Thymus zygis* L. incrementan las concentraciones de aceite esencial y la riqueza en timol (Sotomayor *et al.*, 2004). En sentido opuesto respecto a las condiciones de disponibilidad de agua encontramos los resultados obtenidos por Fonseca *et al.* (2006), en los que *Tanacetum parthenium* Sch. Bip. incrementa la concentración de compuestos fenólicos cuando se somete a aportes hídricos frecuentes. Igualmente, en *Thymus vulgaris* (Letchamo & Gosselin, 1994) se han detectado incrementos en su crecimiento, contenido en aceite esencial y fenoles, en condiciones de riego y luz suplementaria. Jordán *et al.* (2003) no encuentran ninguna influencia del riego en el contenido de aceite esencial cuando trabaja con *Thymus hyemalis* Lange y, en la misma línea, Hornok (1986) observa que el riego incrementaba el rendimiento en aceite esencial en el cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y en el anís (*Pimpinella anisum* L.), y lo disminuía en eneldo (*Anethum graveolens* L.). En lo que se refiere a la fertilización nitrogenada, también existe la hipótesis basada en el balance de carbono que predice un incremento en el reparto de este elemento hacia los metabolitos secundarios cuando la planta crece bajo deficiencias en nitrógeno (De la Fuente *et al.*, 2003) pero, en sentido opuesto, otros ensayos han demostrado que la fertilización nitrogenada no afecta ni a la cantidad ni a la composición química del aceite esencial en diferentes variedades de hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.) (Chatzopoulou *et al.*, 2006), ni de *Salvia officinalis* (Piccaglia, 1998). Sin embargo, una fertilización rica en potasio afecta positivamente a la concentración de  $\beta$ -tuyona,  $\alpha$ -humoleno,  $\beta$ -cariofileno y *p*-cimeno en esta misma especie (Piccaglia, 1998).

Aumentar la síntesis de aceite esencial es un desafío al que se enfrentan los productores de estas especies y, por lo tanto, entender el papel que juegan los factores de estrés puede ofrecer grandes ventajas a los agricultores y comercializadores de estos productos naturales. Está bien documentado que, en mayor o menor medida, tanto la constitución genética como las condiciones ambientales tienen influencia tanto en la producción como en la composición química de los aceites esenciales (Barra, 2009). Cuando se tiene el objetivo de estudiar o mejorar especies para su cultivo es determinante considerar que la variación química de los aceites esenciales está causada

por factores genéticos y fisiológicos. Por lo tanto, caracterizar e identificar quimiotipos es un elemento fundamental cuando se trabaja con material vegetal para estudios químicos, agronómicos o farmacológicos, ya que las actividades biológicas de los productos derivados de este material vegetal (en este caso aceites esenciales) pueden variar si hay cambios en su composición química. En general, la mayoría de los autores describen las variaciones debidas al factor genético como mayores en comparación al factor ambiental. Por este motivo, muchos polimorfismos intraespecíficos no han sido todavía descritos o lo están siendo muy recientemente (Novak *et al.*, 2006).

En este trabajo se pretende investigar mediante ensayos en campo y en laboratorio, cómo afectan los principales factores climáticos y de manejo agronómico (nivel de fertilización nitrogenada), sobre la cantidad y calidad del aceite esencial producido por la especie *Salvia lavandulifolia*. Además, pretende contribuir al conocimiento del polimorfismo químico existente en las poblaciones naturales. Para poder afirmar que una variación cuantitativa detectada en una población natural de cualquier especie efectivamente identifica a un nuevo quimiotipo deben complementarse estos estudios con otros multidisciplinarios, evaluando el desarrollo de la especie en distintos ambientes y/o con distintas condiciones de cultivo. En definitiva, la finalidad de los trabajos que aquí se presentan es la de dar respuesta, con datos obtenidos tanto en ensayos de campo como de laboratorio, a algunas cuestiones que se plantean en el sector productivo de aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales y generar una información útil que pueda ser empleada por los distintos agentes del mismo, para optimizar las técnicas de cultivo e investigar en nuevas vías de utilización de los aceites esenciales.

## II.OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el potencial con el que cuenta la especie *Salvia lavandulifolia* Vahl. como cultivo alternativo, especialmente en tierras de secano del Centro y Sureste de la Península Ibérica, se planteó esta Tesis doctoral con el principal objetivo de contribuir al conocimiento de la variación química de los aceites esenciales de esta especie, tanto a nivel de sus poblaciones naturales, como a nivel de adaptación al cultivo bajo unas condiciones bio-edafo-climáticas concretas. Este objetivo principal se puede resumir en los objetivos concretos que a continuación se detallan:

1. Caracterizar químicamente los aceites esenciales de las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia* de la provincia de Cuenca y compararlos con las de otras provincias.
2. Conocer la variación química intrapoblacional de esta especie en algunas de las poblaciones muestreadas.
3. Evaluar, mediante ensayos complementarios en ambiente homogéneo y ambiente controlado, la fijación y evolución de los caracteres fitoquímicos de los aceites esenciales producidos por individuos concretos seleccionados de las poblaciones naturales.
4. Estudiar la adaptación de esta especie al cultivo y evaluar las necesidades y requerimientos para su óptimo manejo.
5. Caracterizar químicamente los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la especie.
6. Ensayar su actividad biológica frente a diversas especies bacterianas.
7. Valorar la diversidad química mostrada por esta especie para aprovecharla en futuros procesos de selección y mejora de quimiotipos que puedan tener interés comercial.
8. Divulgar y promover los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones realizadas, dando a conocer el cultivo de PAM como una alternativa real en zonas rurales con la captación del interés del sector industrial y comercial.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

En este apartado, se detalla la metodología empleada en la extracción y análisis de la composición química de los aceites esenciales, además de los análisis de los suelos donde se han desarrollado los experimentos y el registro climatológico durante los años de estudio. La extracción de los aceites esenciales y el análisis de su composición química son comunes a todos los estudios realizados en esta Tesis doctoral, con la única excepción del **Estudio IV.5.** “Variación en la producción de compuestos volátiles de *S. lavandulifolia* inducida por estrés debido a altas temperaturas” donde, debido a la escasez de material vegetal, no se pudo proceder a la extracción de los aceites esenciales mediante hidrodestilación. Este caso, en el que los compuestos orgánicos volátiles fueron aislados mediante el empleo de disolventes orgánicos y ultrasonidos, será descrito en su apartado correspondiente. Se detalla, a continuación, la metodología común al resto de los estudios realizados.

#### III.1. EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES MEDIANTE HIDRODESTILACIÓN

El método de extracción de aceites esenciales mediante hidrodestilación con cohobación fue desarrollado por Clevenger (1928) (figura 3) y se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía. Brevemente, el material vegetal a destilar se introduce fragmentado en un matraz de vidrio. En todos los casos, el material vegetal a destilar consistió en pesos secos de partes aéreas de la planta de alrededor de los 100g. Posteriormente, se añade sal común y agua hasta cubrir totalmente el material vegetal. La sal común aumenta el punto de ebullición y permite obtener una extracción más completa de los compuestos con punto de ebullición más alto. A continuación, se acopla la cabeza de destilación y se suministra calor al matraz mediante una manta térmica, hasta llegar a ebullición. Entonces se mantiene la temperatura hasta agotar la esencia de la planta. El tiempo de extracción es muy variable y depende fundamentalmente de la especie con la que se trabaje. En el caso de *S. lavandulifolia*, el tiempo de extracción fue de 5 horas. Al romperse las cutículas de las glándulas de aceite de la planta, el vapor de agua arrastra los compuestos volátiles que se liberan, pasan por el refrigerante, se condensan y se separan por su distinta densidad e inmiscibilidad con el agua. El volumen total de aceite esencial recogido fue medido en volumen y el rendimiento de la

planta en aceite esencial expuesto como como volumen en mililitros de esencia por cada 100 gramos de material vegetal seco destilado (% v/p). Todas las muestras se recogieron en viales de propileno de 1,5 ml (Eppendorfs), siendo adecuadamente etiquetadas. Este aceite esencial se conservó en oscuridad a -4°C con un agente desecante ( $\text{MgSO}_4$  anhidro).

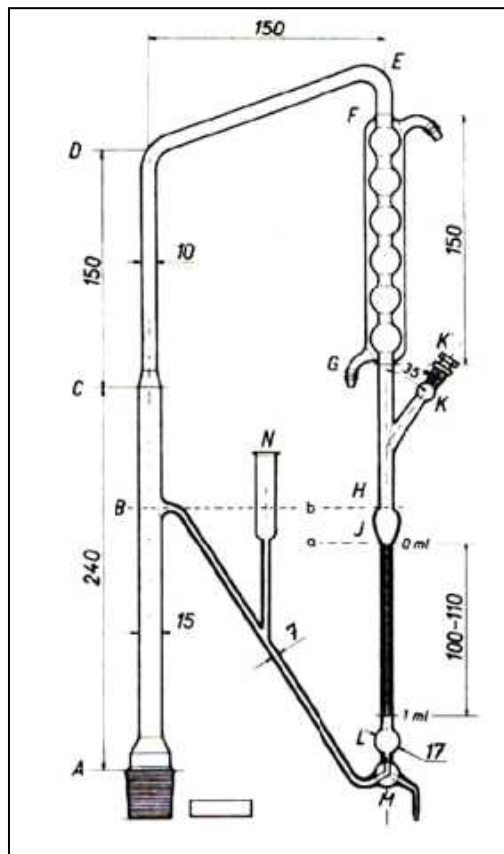


Figura 3.- Cabeza de destilación para la determinación de aceites esenciales en las drogas vegetales (Real Farmacopea Española, 2ª ed., 2002). Las dimensiones expuestas son en milímetros

## III.2. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y COMPUESTOS VOLÁTILES

### III.2.1. Análisis químicos

Para la determinación de la composición química de los aceites esenciales se empleó la Cromatografía de Gases con detector de ionización de llama FID (GC/FID) y,

como complemento, la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS). El trabajo conjunto con estas dos técnicas permite un análisis tanto cualitativo como cuantitativo de los aceites esenciales (Kubeczka, 2010). Los análisis (GC/FID) se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Varian 430-GC equipado con un detector de ionización de llama (FID). Estos análisis se realizaron en el laboratorio de plantas aromáticas del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca). Para la CG/MS se ha empleado un cromatógrafo de gases HP-5890, con un detector selectivo de masas HP-5971A. Esta parte experimental fue realizada en el Centro de Química Orgánica “Lora Tamayo” (Madrid). Las condiciones de trabajo en ambos casos se detallan en el la tabla 4.

Tabla 4.- Condiciones de trabajo y características de los cromatógrafos empleados en los análisis químicos de los aceites esenciales de *S.lavandulifolia*

Características de los aparatos y condiciones de trabajo	Cromatógrafo Varian 430	Cromatógrafo HP-5890
Columna capilar	60 metros x 0,25 mm d.i	50 metros x 0,25 mm d.i
Fase estacionaria	Apolar: DB-5MS 0,25µm de espesor	Apolar: Metil-Silicona 0,25 µm de espesor
Temperatura inyector (°C)	250	250
Temperatura detector (°C)	300	-
Temperatura inicial de trabajo (°C)	70	70
Temperatura final de trabajo (°C)	240	240
Temperatura de la interfase (°C)	-	280
Temperatura de la fuente (°C)	-	230
Rampa de calentamiento	4°C/min + isoterma 5min	6°C/min
Modo Split	1:100	1:20
Gas portador (flujo: mL/min)	Helio (flujo 1.0)	Helio (flujo 1.0)
Energía de ionización (eV)	-	70
Rango de masas m/z		35-350

### III.2.2. Identificación y cuantificación de los compuestos

La identificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando los índices de retención de Kováts (K.I) (Dabrio, 1973), comparándolos con los patrones e índices publicados en la bibliografía (Adams, 2001). Los índices se calcularon mediante la utilización de una serie homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>25</sub>) separados por cromatografía



con las mismas condiciones experimentales que las descritas para los aceites esenciales. Mediante GC/MS se identificaron los compuestos en función de sus espectros de masas, por comparación con los contenidos en librerías comerciales (Adams, 2001). Por lo tanto, una combinación de los índices de Kováts (que a su vez están relacionados con el orden de elución de los compuestos en la columna y su estructura química) y los espectros de masas, dan lugar a una identificación inequívoca para la mayoría de los compuestos que forman parte de los aceites esenciales (figura 4).

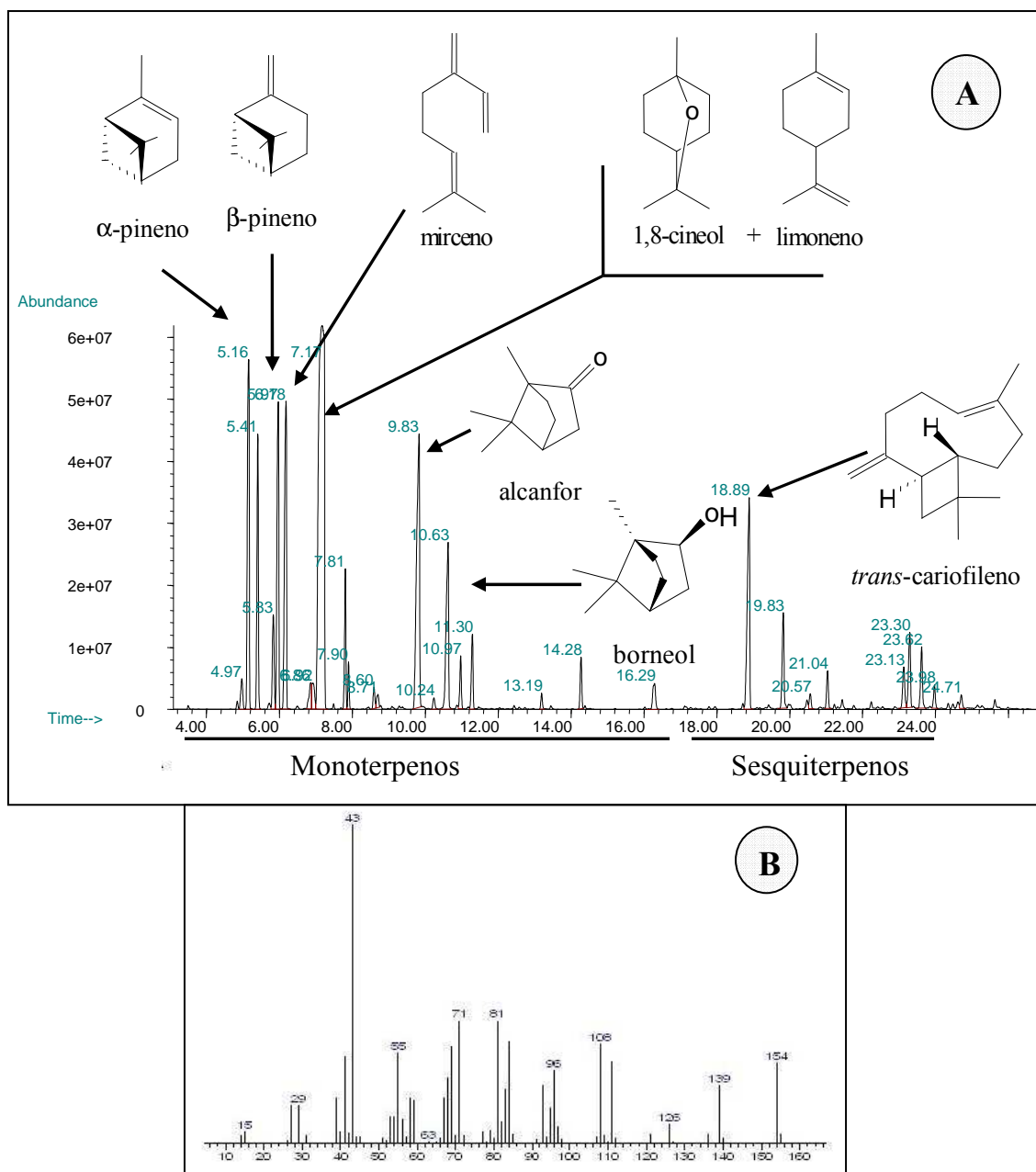


Figura 4.- Cromatograma del aceite esencial de *S. lavandulifolia* y espectro de masas de uno de sus componentes. (A) Posición en el cromatograma de los componentes mayoritarios del aceite esencial. (B) Espectro de masas del compuesto 1,8-cineol.

La cuantificación de los compuestos en los aceites esenciales se midió como porcentajes relativos de cada compuesto en relación al área total. Estos cálculos se realizaron de manera automática mediante el método de proporciones relativas con el software especial de cromatografía Galaxie Varian GC Control Software (USA). En todos los casos, las cuantificaciones provienen de los valores medios de 3 réplicas por muestra. Por otro lado, en todos los compuestos descritos el menor porcentaje relativo detectado es del 0,1%. Salvo excepción expresa, en las tablas del texto únicamente están representados los compuestos cuyos porcentajes relativos son iguales o superiores al 1% en al menos una de las muestras analizadas.

### III.3. ANÁLISIS DE SUELOS

Tanto en las poblaciones naturales (**Estudio IV.1** “Variación intra e interpoblacional de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* y su relación con el área de origen”) como en los experimentos llevados a cabo en el C.I.A de Albaladejito (**Estudios IV.2** “Seguimiento fenológico de la producción y composición química de los aceites esenciales de diversos clones de *S. lavandulifolia* Vahl.”, **IV.4** “Influencia del abonado nitrogenado en el rendimiento y composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* Vahl.” y **IV.5** “Variación en la producción de compuestos volátiles de *S. lavandulifolia* Valh. inducida por estrés debido a altas temperaturas”) se llevaron a cabo análisis de los suelos donde se desarrollaban las plantas. La metodología de muestreo se resume de la siguiente manera:

En primer lugar, en el terreno donde se van a tomar las muestras se traza una W como refleja la figura 5.

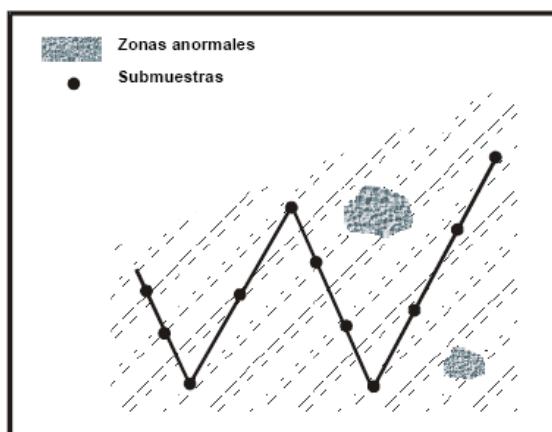


Figura 5.- Ejemplo de itinerario para la recogida de muestras de suelo en parcela.

Dentro de cada una de las zonas de muestreo se obtuvo una muestra de suelo formada, a su vez, por 5 submuestras (entendidas como tales cada una de las extracciones que se hacen con la azada agrícola). Se realizó un muestreo simple al azar: los puntos de muestreo se escogen al azar moviéndose en *zig-zag* a través de la zona homogénea. Con este número de submuestras se consigue disminuir el error de muestreo y que la muestra sea lo más representativa posible de toda la zona donde se desarrollaron las plantas.

Para ello, en todos los casos, se tomaron muestras de suelo hasta una profundidad aproximada de 50 cm tal y como esquematiza la figura 6. Con la azada agrícola se realizó un hoyo y se tomaron las muestras de tierra de la manera indicada en dicha figura (rascando por toda la pared del hoyo exceptuando los 5 cm superiores y aproximadamente 200 gramos de suelo por hoyo). En cada caso se tomaron 5 submuestras que fueron mezcladas de manera homogénea para formar una única muestra problema de alrededor de 1 Kg de tierra.

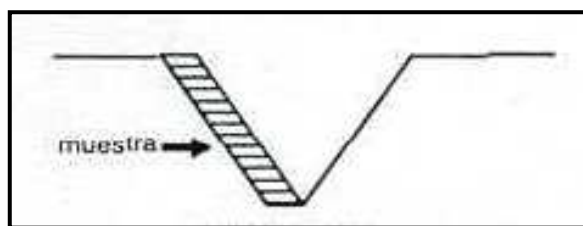


Figura 6.- Esquema de la recogida de muestras de suelo con azada.

La metodología empleada para el análisis de suelos no es objetivo de esta Tesis doctoral. Ésta es únicamente una herramienta para describir las características de los suelos donde se desarrollaron las plantas que han sido objeto de estudio. Por ello, en este apartado sólo se citará las técnicas analítica utilizadas. Para una descripción detallada de toda la metodología utilizada pueden consultarse los textos de Pansu & Gautheyrou (2003) y Margesin & Schinner (2005). Los resultados completos de todos estos análisis edafológicos se detallan en el ANEXO II. En relación a los ANEXOS, en el ANEXO I se puede consultar una exposición detallada de cada uno de los perfiles cromatográficos obtenidos. Estos perfiles se encuentran descritos en forma de tablas. Posteriormente, aparecen otros dos ANEXOS correspondientes a los resultados de los análisis edafológicos y de la estación meteorológica, en los que los resultados están

expresados en forma de gráficas y tablas. Estos son los ANEXOS II y III, respectivamente.

Se citan, a continuación, los métodos utilizados para cada uno de los análisis efectuados en cuanto a la descripción edafológica.

TEXTURA: *Método de Boyoucos*

CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA: *1:5 o pasta saturada.*

MATERIA ORGÁNICA: *Método de Walkley-Black*

NITRÓGENO TOTAL: *Método de Kjeldahl*

NITRÓGENO NITRICO: *Extracción con sulfato cálcico.*

FÓSFORO ASIMILABLE: *Método de Olsen.*

CARBONATOS TOTALES: *Calcímetro Bernard.*

CALIZA ACTIVA: *Oxalato amónico; calcímetro Bernard.*

POTASIO, SODIO, CALCIO y MAGNESIO ASIMILABLES:  
*Extracción con acetato amónico; espectrofotometría de Absorción Atómica.*

CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO:  
*Método del acetato sódico.*

HIERRO, ZINC, COBRE Y MANGASENO ASIMILABLES:  
*extracción con EDTA; espectrofotometría de Absorción Atómica.*

BORO ASIMILABLE: *Método de la Azometina*

#### IV.- ESTUDIOS

A continuación se exponen los 6 trabajos en que se ha dividido esta Tesis doctoral. Cada trabajo se encuentra detallado en su apartado correspondiente. Este formato de agrupación por trabajos independientes hace más comprensible la exposición de los resultados obtenidos, así como la discusión general que engloba a todos ellos y las conclusiones finales. La organización de cada estudio está dividida en los apartados de Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión. Los estudios en que se ha dividido esta Tesis doctoral son los siguientes:

**IV.1.** Variación intra e interpoblacional de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* Vahl. y su relación con el área de origen.

**VI.2.** Seguimiento fenológico de la producción y composición química de los aceites esenciales de diversos clones de *S. lavandulifolia* Vahl.

**VI.3.** Diversidad en la composición química de los aceites esenciales de tallos, hojas y flores de *S. lavandulifolia* Vahl.

**VI.4.** Influencia del abonado nitrogenado en el rendimiento y composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* Vahl.

**VI.5.** Variación en la producción de compuestos volátiles de *S. lavandulifolia* Vahl. inducida por estrés debido a altas temperaturas.

**VI.6.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* Vahl.

## IV.1. VARIACIÓN INTRA E INTERPOBLACIONAL DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *S. lavandulifolia* Vahl. Y SU RELACIÓN CON EL ÁREA DE ORIGEN

### IV.1.1. Introducción

El uso de los metabolitos secundarios para complementar la taxonomía vegetal está ampliamente reconocido (Gottlieb, 1982). Debido a su gran importancia económica, la composición química de los aceites esenciales de las salvias, en general, y de *Salvia officinalis*, en particular, ha sido ampliamente estudiada (para mayor información consultar la revisión bibliográfica específica de Kintzios (2000)).

Por otra parte, los aceites esenciales han sido empleados para llevar a cabo estudios de diversidad intra-específica y de patrones biogeográficos en diversas especies, incluidas algunas representativas de la familia *Lamiaceae*, como los tomillos (*Thymus* sp.) (Cañigüeral *et al.*, 2003; Tommasi *et al.*, 2007;), los espliegos y las lavandas (*Lavandula* sp.) (Skoula *et al.*, 1996; Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007) o las salvias (*Salvia* sp.) (Maksimovic *et al.*, 2007; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010), entre muchas otras. A la vista de éstos y otros estudios, la composición química de las poblaciones naturales de la mayoría de las especies revela un gran polimorfismo. Estos polimorfismos pueden ser debidos a variaciones genotípicas, geográficas, climáticas, fenológicas o a distintas prácticas culturales. Además, en el caso de aceites esenciales comerciales, estas diferencias pueden ser debidas al método de extracción o a las posibles adulteraciones, si las hubiere. Considerando todos estos condicionantes, los estudios y conclusiones quimiotaxonómicas deben estar basados en materias primas comparables, desarrolladas y recolectadas o cosechadas bajo circunstancias igualmente comparables. Debido a esta gran variabilidad, la selección de genotipos con las características fitoquímicas deseables, debería resultar una tarea relativamente sencilla. Destacar que el término genotipo para denominar a pies de planta individuales está ampliamente descrito en la bibliografía (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007; Franz & Novak, 2010; Schmidt, 2010). Sin embargo, en muchos casos, se ha prestado poca atención a la hora de evaluar a gran escala las variaciones fitoquímicas dentro de las poblaciones naturales de especies de interés comercial. Esta información debe ser crucial a la hora de desarrollar programas de conservación y selección de parentales para procesos de selección y mejora de variedades de interés comercial.

*Salvia lavandulifolia* Vahl. es una especie con gran potencial de mercado, además de estar incluida entre las especies que experimentará un mayor aumento en la demanda (Peroy, 2003), y de estar siendo actualmente estudiada para su uso en tratamientos de enfermedad de Alzheimer y Parkinson debido a la demostrada capacidad anticolinesterasa de sus aceites esenciales (Perry *et al.*, 2003; Tildesley, *et al.*, 2005; Kennedy & Wightman, 2011). Pero a pesar de ello, han sido escasos los trabajos desarrollados para evaluar la variabilidad fitoquímica intraespecífica de esta especie en la Península Ibérica. Aunque existen diversas referencias a la diversidad en la composición química que presentan los aceites esenciales de esta especie (Guillén & Ibargoitia, 1995; Zarzuelo *et al.*, 1995; Guillén *et al.*, 1996; Guillén & Manzanos, 1999; Giannoulli & Kintzios, 2000), sin embargo, estos trabajos no reflejan de manera clara la variabilidad existente en las poblaciones naturales por utilizar algunos de ellos material vegetal cultivado o por no especificar su procedencia, en algún caso. Nuestro grupo de investigación, en colaboración con otros, ha comenzado un proyecto de caracterización fitoquímica de las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia* en la Península Ibérica. Esta comparación está basada en la extracción y en el análisis de la composición química de los aceites esenciales de poblaciones en las que se ha realizado un muestreo aleatorio de individuos (al menos 25 por población). Para evitar posibles variaciones debido al estado fenológico de las plantas, todas las poblaciones se muestrean en estado de plena floración. Con esta metodología básica se ha descrito la variabilidad que presentan los aceites esenciales de esta especie en poblaciones naturales de la región de Castilla-La Mancha (Herraiz-Peñalver, *et al.*, 2010). En general, en la mayoría de las especies, las variaciones cualitativas y cuantitativas observadas provienen de dichas prospecciones aleatorias de individuos de una población en un mismo estado fenológico. Esto es lo que determina el perfil químico de una población o de una especie. Sin embargo, dependiendo del número de individuos que se muestreen de cada población, la composición química resultante puede variar (Franz, 2000). Este hecho dependerá del número de quimiotipos existentes, su heredabilidad y las frecuencias de distribución en la población, entre otros factores.

El principal objetivo de este trabajo es la continuación de los trabajos de caracterización química de las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia*, así como extender dicha caracterización a nivel intrapoblacional para una mejor comprensión y estimación de esta variabilidad entendida como quimiotipos individuales. Además, un segundo objetivo es el de evaluar las diferencias en cuanto a la producción de aceite

esencial tanto de las poblaciones seleccionadas, en general, como de las plantas individuales, en particular.

#### IV.1.2. Material y Métodos

##### IV.1.2.1. Prospección, recolección de material vegetal, conservación de germoplasma y caracterización química de los aceites esenciales de poblaciones naturales de *Salvia lavandulifolia* Vahl.

Esta parte del trabajo tiene como origen las labores de prospección de las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia* realizadas en los proyectos RTA 2005-00168-C04-04: “Prospección, recolección y conservación de germoplasma, caracterización química, selección, estudios de propagación y cultivo ecológico, de poblaciones silvestres de P.A.M.” y RTA 2009-00062-C03-01 “Selección y mejora agronómica y química de las poblaciones silvestres españolas de los géneros *Lavandula latifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulifolia* y *Thymus mastichina* ya caracterizadas químicamente”. Uno de los principales objetivos de estos proyectos es la elaboración de mapas de distribución silvestre de los quimiotipos de las especies estudiadas, en relación a la riqueza en principios activos. En base a esto, algunas de las poblaciones de *S. lavandulifolia* descritas y localizadas durante el desarrollo de los proyectos mencionados, han sido seleccionadas para su prospección (imagen 4), recolección de material vegetal, conservación de germoplasma (imágenes 5 y 6) y caracterización química de los aceites esenciales. La planificación y el desarrollo se han realizado de la siguiente manera:



Imagen 4.- GPS, planos y notas para la localización geográfica de las poblaciones de *S. lavandulifolia*.

1.- Debido a que ambos proyectos mencionados abarcan una prospección y caracterización de la especie en toda la Península Ibérica, para esta Tesis doctoral únicamente se han seleccionado las poblaciones localizadas en la provincia de Cuenca. Además, se han prospectado nuevas poblaciones en las provincias de Albacete, Murcia y Almería.



2.- Todas las poblaciones fueron localizadas geográficamente mediante GPS. De cada una de las poblaciones se recolectó parte aérea de las plantas (tallos y hojas) en estado de baja actividad biológica durante los meses de Febrero y Marzo de 2008. Esta recolección consistió en una selección aleatoria de 25 pies individuales de cada población. El material recolectado se mezcló de forma homogénea como una sola muestra en cada una de las poblaciones. Una vez secado a temperatura ambiente en laboratorio, ese material vegetal se destinó a la extracción (Apartado III.1) y posterior análisis químico de los aceites esenciales (Apartado III.2). Además, de cuatro de las poblaciones recolectadas se seleccionaron aleatoriamente tres plantas individuales, las cuales se reprodujeron vegetativamente en invernadero en el Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca) según lo detallado en el Apartado IV.2.2.2. Estas cuatro poblaciones fueron las de Torralba (A), Campillo-Paravientos (B), Huélamo (C) y Huerta del Marquesado (D). A diferencia de las poblaciones que fueron recolectadas una sola vez, las plantas individuales fueron recolectadas en origen en tres ocasiones a lo largo del año 2008. En primer lugar en estado de baja actividad metabólica junto con las poblaciones, una segunda vez en estado de floración y en una tercera ocasión en estado de maduración completa de las semillas. Las partes aéreas de estas plantas siguieron el mismo tratamiento que el material vegetal proveniente de las poblaciones naturales.



Imagen 5.-Semillas de *S. lavandulifolia*.

Imagen 6.- Banco de germoplasma (Centro de Investigación Agraria de Albaladejito, Cuenca).

3.- Cada una de las poblaciones naturales y las plantas individuales estudiadas fueron depositadas en centros oficiales, bien como pliegos de herbario, bien como colección de material vegetal o germoplasma. Más concretamente, las poblaciones localizadas por los proyectos INIA se depositaron como material inventariado de la red de colecciones del Programa Nacional de Conservación y Utilización de Recursos Genéticos y las plantas individuales de las cuatro poblaciones seleccionadas para este Estudio y para los **Estudios IV.2** y **IV.5** fueron depositadas como pliegos testigo en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (MACB) y como germoplasma en el Banco de Germoplasma del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (BGV-CU. Código ESP 124). Todos los códigos de inventario así como las coordenadas de las poblaciones, altitud y piso bioclimático se encuentran detallados en la tabla 5.

Tabla 5.- Localización geográfica de las poblaciones de *S. lavandulifolia*.

Población	Provincia	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Piso bioclimático	Número de Inventario/Herbario
Barajas de Melo (Bm)	Cuenca	40°05'22''N	2°53'18''W	849	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085370
Puebla de Don Francisco (Pb)	Cuenca	40°12'20''N	2°40'08''W	1015	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085371
Villanueva Guadamejud (Vg)	Cuenca	40°13'28''N	2°30'58''W	837	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085372
Cuevas de Velasco (Cv)	Cuenca	40°10'54''N	2°24'38''W	1078	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085373
Villar Domingo García (Vd)	Cuenca	40°14'52''N	2°17'51''W	958	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085374
Priego (Pr)	Cuenca	40°26'13''N	2°19'38''W	822	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085375
Alcantud (Al)	Cuenca	40°30'58''N	2°19'36''W	801	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085376
San Pedro Palmiches (Sp)	Cuenca	40°29'06''N	2°18'55''W	820	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085377
Buciegas (Bu)	Cuenca	40°19'33''N	2°27'29''W	822	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085378
Villalba del Rey (Vr)	Cuenca	40°22'35''N	2°39'39''W	795	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085379
Valdecolmenas de Abajo (Va)	Cuenca	40°07'25''N	2°27'00''W	903	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085486
Villar del Maestre (Vm)	Cuenca	40°07'46''N	2°24'10''W	1104	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085487
Huete (Hu)	Cuenca	40°15'47''N	2°36'35''W	901	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085388
Garcinarro (Ga)	Cuenca	40°11'26''N	2°43'52''W	776	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085389
Buendía (Ba)	Cuenca	40°19'04''N	2°46'19''W	909	Meso-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC085490
<b>Torralba (A)</b>	Cuenca	40°20'00''N	2°16'33''W	870	Meso-Mediterráneo	<sup>b</sup> MACB-102597 al 99/ <sup>c</sup> BCU003162 al 64
<b>Campillo-Paravientos (B)</b>	Cuenca	39°56'11''N	1°30'25''W	1116	Supra-Mediterráneo	<sup>b</sup> MACB-102594 al 96/ <sup>c</sup> BCU003165 al 67
<b>Huélamo (C)</b>	Cuenca	40°17'14''N	1°48'08''W	1326	Oro-Mediterráneo	<sup>b</sup> MACB-102591 al 93/ <sup>c</sup> BCU003168 al 70
<b>Huerta del Marquesado (D)</b>	Cuenca	40°07'34''N	1°39'50''W	1377	Oro-Mediterráneo	<sup>b</sup> MACB-102588 al 90/ <sup>c</sup> BCU003171 al 73
Letur (Le)	Albacete	38°14'27''N	2°10'12''W	1075	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC086011
Moratalla (Mo)	Murcia	38°11'35''N	2°11'22''W	1165	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC086012
Velez Blanco (Vb)	Almería	37°41'24''N	2°08'12''W	1464	Supra-Mediterráneo	<sup>a</sup> NC086013

Las poblaciones en negrita indican en las que han sido seleccionadas plantas individuales. Las tres plantas individuales seleccionadas en cada población tienen número de registro.

a Número de Inventario de la red de colecciones del Programa Nacional de Conservación y Utilización de Recursos Genéticos

b Número de registro del herbario MACB

c Número de registro del Banco de Germoplasma del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca)

#### **IV.1.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales**

Tanto la extracción como los análisis químicos de los aceites esenciales se llevaron a cabo conforme a la metodología descrita en el apartado de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES (Apartados III.1 y III.2, respectivamente).

#### **IV.1.2.3. Análisis de suelos**

Los análisis de suelos en este trabajo se llevaron a cabo tal y como se indica en el apartado de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES (Apartado III.3).

#### **IV.1.2.4. Análisis de datos**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2001) y con el programa R (R Development Core Team, 2007). Para describir la variación producida por la observación de la composición química de los aceites esenciales, se utilizaron técnicas descriptivas multivariantes. Se han empleado el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Conglomerados (CA). En ambos casos el principal objetivo es el de generar hipótesis sobre las relaciones existentes en cuanto a la composición química entre las poblaciones y entre los individuos analizados.

El análisis PCA se utilizó para describir interrelaciones entre las poblaciones o los genotipos y sus constituyentes químicos en el aceite esencial. En todos los casos, los dos o tres primeros componentes reúnen la mayor parte de la variación producida por la composición química (variables) de las esencias (casos). Los componentes principales se calcularon a través de la matriz de correlaciones previa a la estandarización de los datos. En cada caso, de todas las variables observadas, se han utilizado en el análisis las que hayan sido citadas en el texto como compuestos mayoritarios (compuestos cuyos porcentajes relativos son iguales o superiores al 1% en al menos una de las muestras analizadas).

El análisis CA se utilizó para estudiar las similitudes entre los casos estudiados en relación a la composición química de los aceites esenciales. Para la construcción de las matrices de proximidad se han utilizado distancias euclídeas, y como tipo de

agrupamiento para la formación de conglomerados, se ha optado por el denominado Método de Ward.

La significación en la variación de la biosíntesis de aceite esencial entre las distintas épocas de recolección de las plantas individuales se evaluó utilizando el análisis de la varianza (ANOVA). Por otro lado, se realizó un análisis jerárquico de la varianza (ANOVA encajado) para estimar los componentes de la varianza para el rendimiento en aceite esencial, dividiendo la variación entre poblaciones y entre individuos dentro de una misma población. Previa a su aplicación, la normalidad de las poblaciones y su homocedasticidad fueron evaluadas mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente.

Finalmente, la variabilidad en la composición química respecto a los compuestos mayoritarios y los factores edáficos más determinantes a la hora del manejo del cultivo se obtuvo mediante un análisis de correlación canónica. Previo al análisis, todas las variables fueron estandarizadas.

### **IV.1.3. Resultados**

Para este estudio se recolectaron un total de 34 muestras de distintas plantas, distribuidas en 22 poblaciones naturales y 12 plantas individuales (3 individuos x 4 poblaciones). De todas ellas, se aislaron los aceites esenciales por medio de hidrodestilación, calculando su rendimiento y analizando su composición química mediante GC y GC/MS. Para una mejor exposición y comprensión se muestran los resultados de rendimientos en aceite esencial y composición química en apartados diferentes.

#### **IV.1.3.1 Rendimiento en aceite esencial**

A nivel poblacional, los rangos en la producción de aceite esencial encontrados van desde los 0,6% de la población *Al* (Alcantud) hasta los 1,8% de la población *Ba* (Buendía), ambas encuadradas en el piso Mesomediterráneo (figura 7). Dentro de las poblaciones encuadradas en el piso Supramediterráneo, las mayores producciones de esencia corresponden a la localidad *B* (Campillo-Paravientos), con un rendimiento del 1,7%, mientras que las menores producciones provienen de la población *Le* (Letur), con un rendimiento del 0,9%. Únicamente dos localidades están encuadradas en el piso

Oromediterráneo, teniendo ambas rendimientos altos en la producción de esencia (1,5 y 1,6%).

Individualmente, los genotipos seleccionados de las cuatro poblaciones objeto de estudio muestran también una marcada variabilidad en cuanto a la producción de aceite esencial. Se exponen, en la figura 8, los rendimientos obtenidos durante los tres momentos de prospección de material vegetal durante el año 2008 dentro de las poblaciones naturales donde se seleccionaron pies individuales concretos. En este caso, los rangos en la producción de esencia van desde 0,7% del ejemplar *CI* (localidad de Huélamo, en recolección de octubre) hasta 3,4% del ejemplar *B2* (localidad de Campillo-Paravientos, en recolección de junio). No existen diferencias significativas en un test ANOVA en cuanto al rendimiento en aceite esencial entre las diferentes épocas de recolección ( $F=0,529$ ;  $p=0,593$ ). Por otro lado, un análisis de ANOVA encajado para las 4 poblaciones donde se seleccionaron los genotipos indica que las diferencias en la producción de aceite esencial son significativas a nivel de las poblaciones (tabla 6). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la producción de esencia dentro de las poblaciones analizadas.

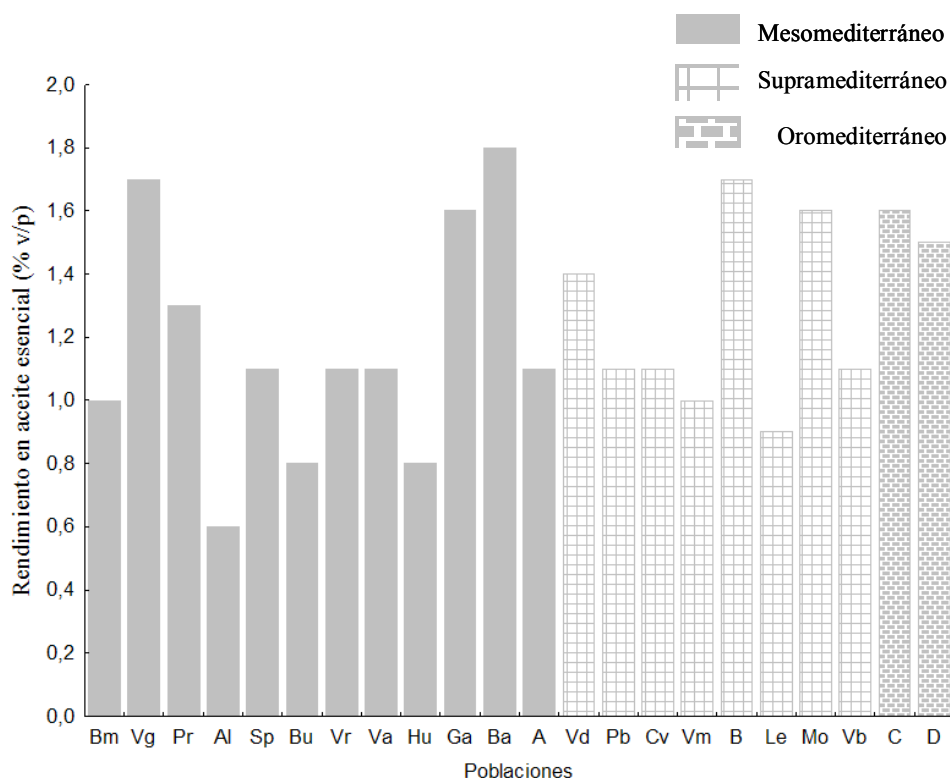


Figura 7.- Rendimiento en aceite esencial de las poblaciones naturales seleccionadas de *S. lavandulifolia* localizadas en tres pisos bioclimáticos distintos.

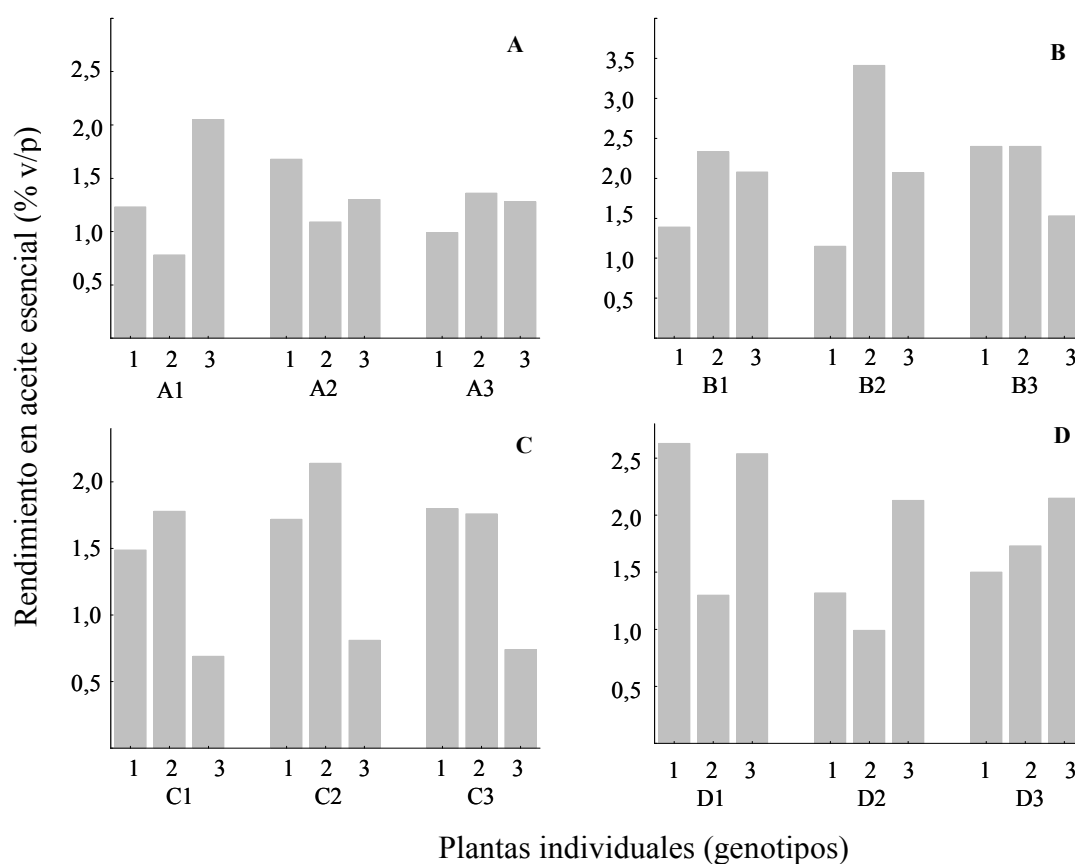


Figura 8.- Rendimiento en aceite esencial de los genotipos seleccionados de las cuatro poblaciones de *S. lavandulifolia*. Las letras en negrita indican las poblaciones, siendo éstas A (Torralba), B (Campillo-Paravientos), C (Huélamo) y D (Huerta del Marquesado). Los números indican la época de la recolección de material vegetal, siendo éstos marzo (1), junio (2) y octubre (3) de 2008, respectivamente.

Tabla 6.- ANOVA encajado para el rendimiento en aceite esencial de las poblaciones y genotipos seleccionados de *S. lavandulifolia*.

Fuente de variación	g.l	MS	F	P
Población	3	1,132	9,781	< 0,01
Individuo (Población)	8	0,116	0,312	0,95
Error	24	0,372		

El análisis incluye los grados de libertad (g.l), cuadrados medios (MS), estadístico de contraste (F) y probabilidad (P) para cuatro localidades, con tres individuos en cada localidad y tres muestras de cada individuo.

#### IV.1.3.2 Composición química

A nivel poblacional, se identificaron un total de 58 compuestos que representan entre el 71,2 y el 97,6% del total integrado por cromatografía (Anexo I, Tabla B). Entre estos compuestos, la suma de 17 de ellos representa entre un 67,1 y un 93,3% del total de compuestos identificados (tabla 7). Se considera que estos compuestos tienen un porcentaje relativo en el aceite esencial que les hace representativos. En adelante, a estos compuestos se les denominará compuestos mayoritarios. Los compuestos mayoritarios detectados son:  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno,  $\beta$ -pineno + mirceno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, linalol, alcanfor, borneol, terpinen-4-ol, acetato de  $\alpha$ -terpenilo, *trans*-cariofileno, (*E*)- $\beta$ -farneseno, espatulenol, óxido de cariofileno y viridiflorol. En todos los casos, los compuestos con mayores porcentajes relativos son el 1,8-cineol o el alcanfor. El rango del 1,8-cineol varía de 15,2 a 53,4% y el del alcanfor de 1,9 a 28,6%. La fracción monoterpénica representa en todos los casos más del 75% del total identificado, siendo los monoterpenos oxigenados mayoritarios frente a los hidrocarbonados. La fracción sesquiterpénica es, en todos los casos, poco representativa. Para identificar posibles relaciones entre el origen geográfico de las poblaciones de *S. lavandulifolia* y la concentración de los compuestos volátiles mayoritarios, se utilizaron técnicas estadísticas multivariantes exploratorias como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Conglomerados (CA). Los datos que aparecen en las figuras 9 y 10 se obtuvieron de la matriz de correlaciones previa estandarización de los datos provenientes de los porcentajes relativos de los compuestos que han sido citados en el texto como mayoritarios. La figura 9A muestra la distribución de los compuestos volátiles mayoritarios con mayor correlación en las poblaciones de *S. lavandulifolia* estudiadas. La distribución de las poblaciones viene representada en la figura 9B. Los tres primeros factores extraídos agrupan una varianza total de 71,75%. Como se aprecia en ambas subfiguras, el plano representado con los dos primeros componentes agrupa una varianza del 56,64%. El primer componente (F1) está altamente correlacionado de manera positiva con 1,8-cineol y sabineno y de manera negativa con los compuestos canfeno y alcanfor. El segundo componente (F2) tiene alta correlación negativa para  $\alpha$ -pineno, limoneno y para el conjunto  $\beta$ -pineno + mirceno. En ambos casos, la correlación es menos intensa para los restantes compuestos representados. En análisis PCA usando los dos primeros componentes sugiere la segregación de las poblaciones en tres grandes grupos (figura 9B).



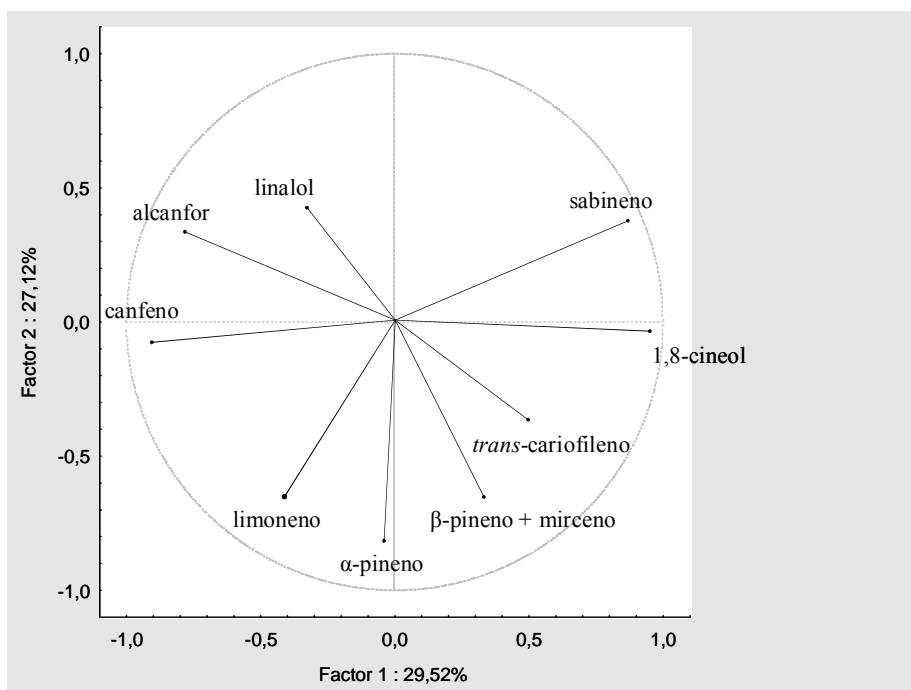
Tabla 7.- Composición química de los aceites esenciales de las poblaciones de *S. lavandulifolia*.

Compuesto	I.K	POBLACIONES																					
		Bm	Pb	Vg	Cv	Vd	Pr	Ad	Sp	Vu	Vr	Va	Vm	Hu	Ga	Ba	A	B	C	D	Le	Mo	Al
$\alpha$ -pineno	942	6,8	4,9	9,6	9,6	7,2	5,3	3,9	6,8	7,6	7,2	5,7	6,8	7,6	7,7	6,8	9,3	5,6	6,1	7,7	3,0	4,2	2,7
canfeno	961	3,9	3,7	8,3	4,8	5,2	5,9	4,3	4,5	9,6	9,1	4,9	5,7	3,5	5,0	8,0	3,5	1,2	2,0	0,6	5,2	8,3	4,9
sabineno	981	0,4	0,5	0,1	0,1	0,1	0,8	0,7	0,1	0,1	0,1	0,6	0,8	0,1	0,1	0,1	0,2	3,6	3,4	3,5	0,4	1,3	1,2
<b><math>\beta</math>-pineno + mirceno</b>	991	11,8	16,7	10,1	10,6	11,2	9,2	12,1	11,0	13,8	10,2	11,0	11,8	17,6	11,3	13,9	14,1	11,0	11,5	13,4	4,8	5,1	2,4
p-cimeno	1032	2,0	2,6	3,0	2,9	2,2	1,1	0,8	2,2	3,8	2,5	0,8	1,0	2,5	2,5	2,2	1,5	0,6	0,8	1,1	0,7	0,5	0,8
<b>limoneno</b>	1038	9,1	9,4	12,3	10,5	8,5	7,8	7,0	10,0	9,9	8,1	9,5	9,3	7,6	11,3	11,0	11,8	2,8	8,0	3,5	3,5	3,0	3,4
<b>1,8-cineol</b>	1044	28,0	35,6	26,2	32,0	23,8	22,9	26,5	26,2	15,2	18,4	26,4	31,1	37,6	24,8	20,7	32,9	49,3	42,3	53,4	22,9	24,8	18,7
linalol	1102	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	2,6	0,6	0,2
<b>alcanfor</b>	1164	20,3	7,0	12,9	10,3	12,1	24,7	11,4	16,8	20,8	22,1	10,1	12,5	10,2	19,5	18,8	10,4	2,0	9,4	1,9	28,5	28,6	27,7
borneol	1187	2,7	3,4	3,7	3,7	4,5	4,5	6,1	2,7	2,5	5,3	6,8	4,3	1,6	2,3	4,4	2,7	1,2	2,7	0,5	4,7	3,5	1,5
terpinen-4-ol	1193	0,7	0,7	0,7	0,6	1,2	0,5	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,7	0,8	1,0	0,7	0,6	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,5
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1355	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,7	0,1	0,1	-	-	0,5	-	0,1	0,1	0,1	0,3	1,5	0,5	0,2	0,7	0,5	-
<i>trans</i> -cariofileno	1441	0,4	1,0	1,4	2,0	0,7	1,4	0,9	0,9	0,9	0,8	1,4	0,8	0,7	1,1	0,9	2,7	0,9	1,4	1,7	0,5	0,3	0,4
( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1477	0,2	0,7	1,1	1,1	0,4	0,2	0,1	1,4	0,8	0,5	0,8	0,2	0,2	0,6	1,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,5	0,1	0,2
espatulenol	1600	0,6	0,5	-	0,2	0,1	1,4	2,5	-	0,2	0,1	1,0	0,5	0,1	-	0,1	-	0,1	1,0	0,2	0,6	0,7	1,6
óxido de cariofileno	1609	0,9	1,0	1,1	1,7	1,5	2,6	3,9	1,1	1,6	1,3	3,3	1,8	1,0	0,9	0,9	1,4	2,4	2,5	2,9	1,0	0,7	0,9
viridiflorol	1621	0,8	0,7	2,6	0,1	7,6	1,5	6,7	1,8	2,4	3,7	3,5	1,8	0,1	0,8	2,4	0,1	3,0	0,1	-	3,4	0,2	-
% Total representado		89,0	88,7	93,3	90,4	86,7	90,7	88,0	86,5	90,1	90,5	87,2	89,5	91,4	89,2	92,3	91,8	85,8	92,6	91,7	83,4	82,9	67,1
% Total identificado		94,0	94,0	96,6	95,8	93,4	96,1	94,1	92,6	94,7	95,0	94,0	95,0	95,6	94,9	96,2	97,0	93,9	97,3	97,6	92,0	86,8	71,2
Monoterpenos hidrocarbonados		34,9	38,5	44,0	39,1	35,6	30,8	29,2	35,4	45,7	37,9	33,0	35,9	39,7	38,9	42,7	41,0	25,0	32,2	30,3	17,9	22,8	15,6
Monoterpenos oxigenados		55,7	50,6	45,7	49,5	45,8	57,0	49,1	48,6	41,9	49,7	49,0	53,1	52,2	51,0	46,9	50,4	59,1	58,6	61,5	66,4	61,2	52,4
Sesquiterpenos hidrocarbonados		1,3	2,5	3,1	4,6	2,4	2,5	1,6	4,5	2,7	2,1	3,6	1,6	2,3	3,1	2,9	3,9	3,2	2,6	2,2	1,7	0,6	0,7
Sesquiterpenos oxigenados		2,6	2,6	4,3	2,7	9,8	6,3	14,4	4,0	4,8	5,7	8,8	4,7	1,8	2,1	3,8	2,2	6,5	4,2	4,1	5,8	1,9	2,5

Los compuestos en negrita superan el 10% de porcentaje relativo en al menos una de las poblaciones. La localización de las poblaciones se puede consultar en la tabla 5 del apartado de *Material y Métodos*.

PCA con distribución de variables

A Mapa de distribución de variables (ejes F1 y F2: 56,64%)



PCA con distribución muestras

B Mapa de distribución de muestras (ejes F1 y F2: 56,64%)

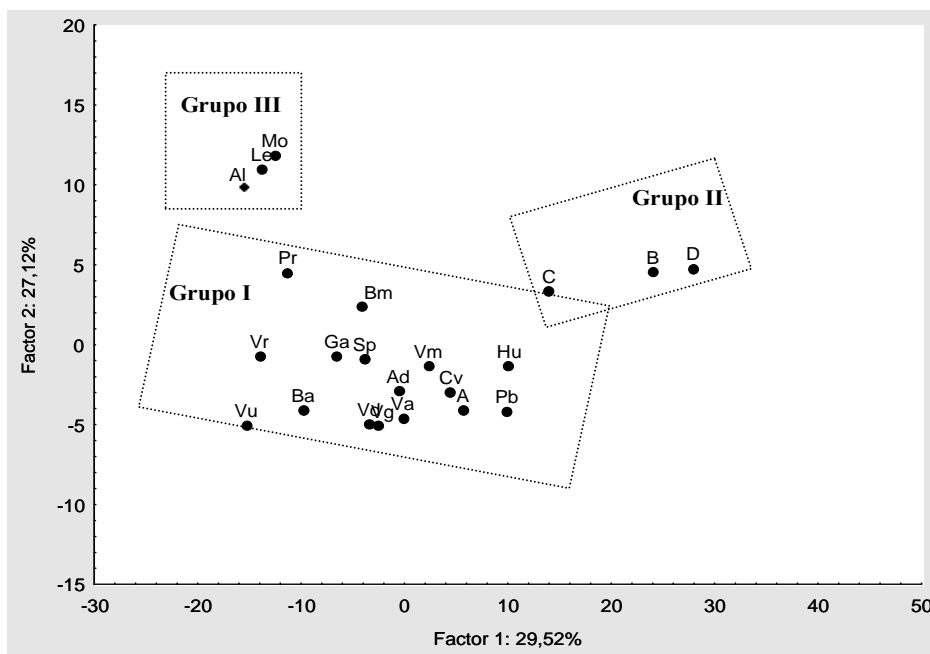


Figura 9.- PCA de la composición química de los aceites esenciales de las poblaciones de *S. lavandulifolia*. (A) PCA de distribución de variables. (B) PCA de distribución de las poblaciones.

El grupo I incluye a todas las poblaciones de la comarca de La Alcarria. Estas poblaciones están caracterizadas por un contenido medio-bajo de 1,8-cineol (15,2-35,6%) y un alto contenido de canfeno (3,5-9,6%) y alcanfor (7-24,7%), en relación con las poblaciones del grupo II. Las poblaciones del grupo II están distribuidas en la comarca de la Serranía de Cuenca, donde los porcentajes relativos del principal constituyente del aceite esencial (1,8-cineol) son mayores que en el caso anterior (42,3-53,4%). El grupo III está formado por poblaciones de áreas de montaña de fuera de la provincia de Cuenca: las poblaciones *Le* (Letur) y *Mo* (Moratalla) situadas en la Sierra del Segura en las provincias de Albacete y Murcia, respectivamente, y la población *Al* (Vélez-Blanco) en la Sierra de María-Los Velez en la provincia de Almería. Este grupo se caracteriza, principalmente, por su bajo contenido en 1,8-cineol (18,7-24,8%) y su alto contenido en alcanfor (27,7-28,6%).

El análisis de conglomerados (CA) de la figura 10 está basado en los mismos constituyentes del aceite esencial que el análisis PCA descrito con anterioridad. La estructura general del dendrograma permite diferenciar dos grupos principales.

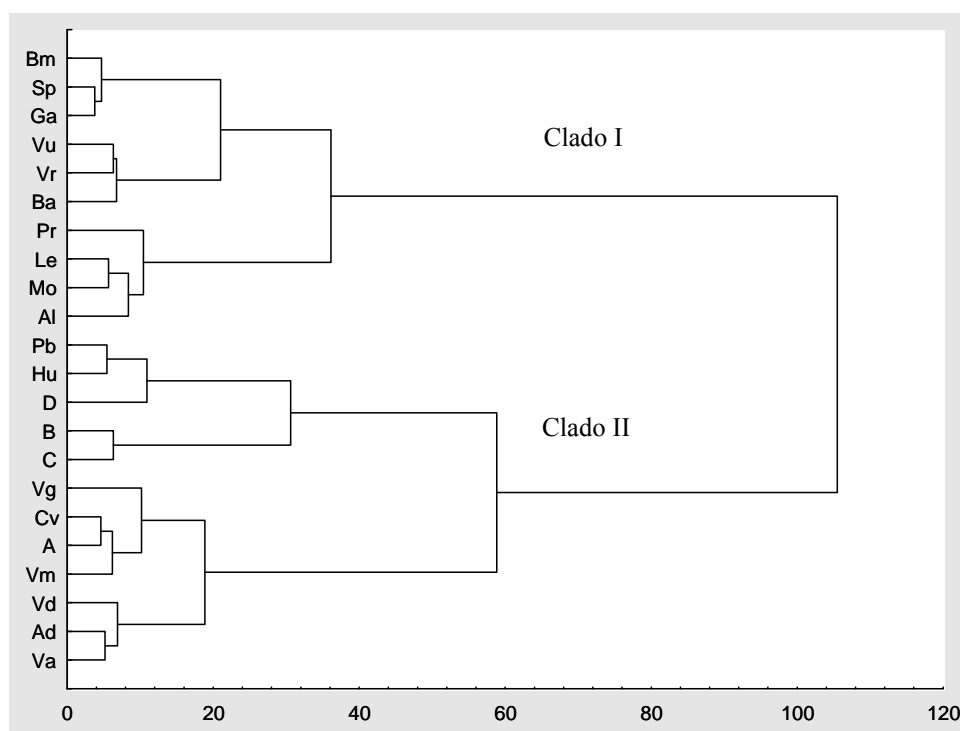


Figura 10.- Análisis de conglomerados (CA) de la composición química de los aceites esenciales de las poblaciones de *S. lavandulifolia* utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre poblaciones.

En primer lugar, poblaciones con porcentajes relativos altos de 1,8-cineol, alrededor del 25% o superior, y porcentajes relativos bajos de alcanfor, alrededor del 15% o inferior, conforman el clado I. De manera opuesta, porcentajes relativos bajos de 1,8-cineol y altos de alcanfor caracterizan al clado II. Esta agrupación también se puede apreciar en el diagrama de PCA (figura 9B). Si trazamos una línea perpendicular al valor 0 del primer factor (F1), las poblaciones a la derecha forman parte del grupo I y las poblaciones a la izquierda forman parte del grupo II. Por lo tanto, existe concordancia entre las dos técnicas multivariantes a la hora de agrupar las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia* conforme a la composición química de los aceites esenciales.

Cuando se estudian las poblaciones a nivel individual también se obtiene una marcada diferencia en la composición química de los aceites esenciales. Se identificaron, a este nivel, un total de 66 compuestos que representan entre el 83,8 y el 99,1% del total de compuestos integrados por cromatografía (Anexo I, Tabla A). En este caso, la suma de 25 de ellos representa entre un 76,5 y un 95,1% del total de compuestos identificados (tabla 8). La tabla 8 resume, al igual que la tabla 7, los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *S. lavandulifolia* y sus porcentajes relativos, en este caso en cada uno de los genotipos estudiados. Los compuestos mayoritarios detectados entre los genotipos son:  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, *cis*-sabineno hidrato, linalol, alcanfor, borneol,  $\alpha$ -terpineol, acetato de bornilo, acetato de  $\alpha$ -terpenilo, *trans*-cariofileno, (*E*)- $\beta$ -farneseno, *ar*-curcumeno, biciclogermacreno,  $\alpha$ -zingibereno,  $\beta$ -bisabolol, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol y  $\beta$ -eudesmol. Por lo tanto, un total de 25 compuestos fueron detectados en al menos un ejemplar con un porcentaje relativo  $\geq 1\%$ , mientras que a nivel interpoblacional el número de estos compuestos fue de 17. En este caso, 4 compuestos son descritos como los de mayor porcentaje relativo en alguno de los genotipos. 1,8-cineol es el mayoritario en 9 de los 12 individuos estudiados (21,8-55,5%). Los restantes, que no tienen como compuesto mayoritario 1,8-cineol, son los genotipos denominados A1, C1 y C2, cuyos compuestos mayoritarios son el alcanfor (24,3%), espatulenol (18,4%) y *trans*-cariofileno (16,6%), respectivamente. De estos compuestos, 1,8-cineol, alcanfor y *trans*-cariofileno fueron detectados en todas las muestras, mientras que espatulenol únicamente fue detectado en 5 genotipos, no sobrepasando el 1% de porcentaje relativo en 4 de ellos.

Tabla 8.- Composición química de los aceites esenciales de los genotipos seleccionados.

Compuesto	I.K	GENOTIPOS											
		Población A			Población B			Población C			Población D		
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
$\alpha$ -pineno	943	4,8	3,3	8,3	8,4	7,0	3,3	0,4	1,4	10,0	6,8	3,5	11,5
canfeno	962	8,1	1,4	3,8	1,6	1,7	0,4	0,2	1,5	0,9	1,5	1,4	0,4
sabineno	981	0,1	3,1	0,1	3,4	3,4	3,4	0,2	1,2	4,7	3,5	3,1	3,5
$\beta$ -pineno + mirceno	991	14,5	13,7	14,2	16,0	14,3	14,7	2,0	16,0	14,6	13,2	13,5	17,2
<i>p</i> -cimeno	1033	1,0	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4	0,1	0,9	0,2	0,4	0,5	0,6
limoneno	1038	4,9	3,6	17,8	2,3	2,3	4,4	1,6	13,8	8,1	3,8	3,6	3,7
1,8-cineol	1044	18,6	49,0	21,8	47,3	48,7	55,5	1,1	3,7	40,3	48,6	48,9	43,8
$\gamma$ -terpineno	1066	0,7	1,1	0,5	1,1	0,8	1,0	0,4	4,3	0,9	0,7	1,1	1,2
<i>cis</i> -sabineno hidrato	1079	0,5	1,1	0,5	0,7	0,8	0,9	0,1	0,1	0,4	0,9	1,1	0,7
linalol	1102	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5	2,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4
alcanfor	1165	24,3	5,5	7,4	2,8	3,9	1,4	3,5	5,4	0,5	3,1	5,3	2,3
borneol	1187	4,6	2,2	3,1	1,2	1,5	0,5	2,8	1,5	0,5	1,5	2,2	0,2
$\alpha$ -terpineol	1206	0,1	1,1	0,2	1,0	1,3	1,3	0,6	0,1	0,1	2,5	1,3	1,0
acetato de bornilo	1296	2,3	0,6	1,8	0,6	0,7	0,1	1,5	1,9	0,4	0,6	0,6	
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1355	-	0,3	0,4	0,6	0,7	0,4	3,4	0,1	-	0,1	0,3	-
<i>trans</i> -cariofileno	1441	3,6	2,2	9,1	1,3	1,3	3,1	10,2	16,6	1,1	3,4	2,4	3,7
( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1477	2,6	2,5	0,4	0,2	0,1	1,3	0,6	2,4	0,4	1,8	2,7	0,6
<i>ar</i> -curcumeno	1491	-	0,2	0,5	-	-	-	1,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4
biciclogermacreno	1514	-	0,2	-	0,2	0,2	-	7,6	0,7	0,2	-	0,3	-
$\alpha$ -zingibereno	1519	-	-	0,4	-	-	-	2,1	-	0,2	0,1	-	0,1
$\beta$ -bisaboleno	1555	-	1,0	-	1,4	1,5	0,4	6,7	6,0	-	0,2	0,9	-
espatulenol	1600	-	0,2	-	-	-	-	18,4	0,7	0,6	-	0,2	-
óxido de cariofileno	1609	0,6	0,8	1,4	0,5	0,6	2,0	6,9	7,6	0,4	1,9	0,9	1,8
viridiflorol	1621	2,3	0,1	-	2,6	2,7	-	0,3	0,1	0,1	0,1	-	-
$\beta$ -eudesmol	1682	-	-	-	-	-	-	2,2	0,4	0,1	0,1	-	-
% Total representado		93,9	93,9	92,3	93,6	94,0	95,0	76,5	86,9	85,0	95,1	94,2	93,1
% Total identificado		97,7	97,9	95,6	98,4	99,2	98,2	84,4	92,2	88,7	98,4	98,1	97,8
Monoterpenos hidrocarbonados		33,8	26,1	45,3	32,4	29,4	27,0	4,5	35,9	38,9	29,6	26,1	33,8
Monoterpenos oxigenados		53,8	63,4	38,6	58,2	61,8	63,8	18,7	18,9	44,5	60,1	63,3	52,1
Sesquiterpenos hidrocarbonados		7,1	6,9	10,6	4,8	4,8	5,3	31,0	27,0	3,4	6,2	7,3	5,8
Sesquiterpenos oxigenados		3,3	1,8	1,7	3,3	3,5	2,5	29,5	10,3	2,0	2,6	1,6	2,6

Tanto los análisis multivariantes de PCA como los de CA se llevaron a cabo con los compuestos que se representan en la tabla 8. La distribución en un análisis PCA que presentan las plantas junto con las poblaciones de donde provienen, indica una marcada distancia entre los aceites esenciales de los genotipos A1, A3, C1 y C2 entre sí, y de éstos con el resto de esencias analizadas (figura 11).

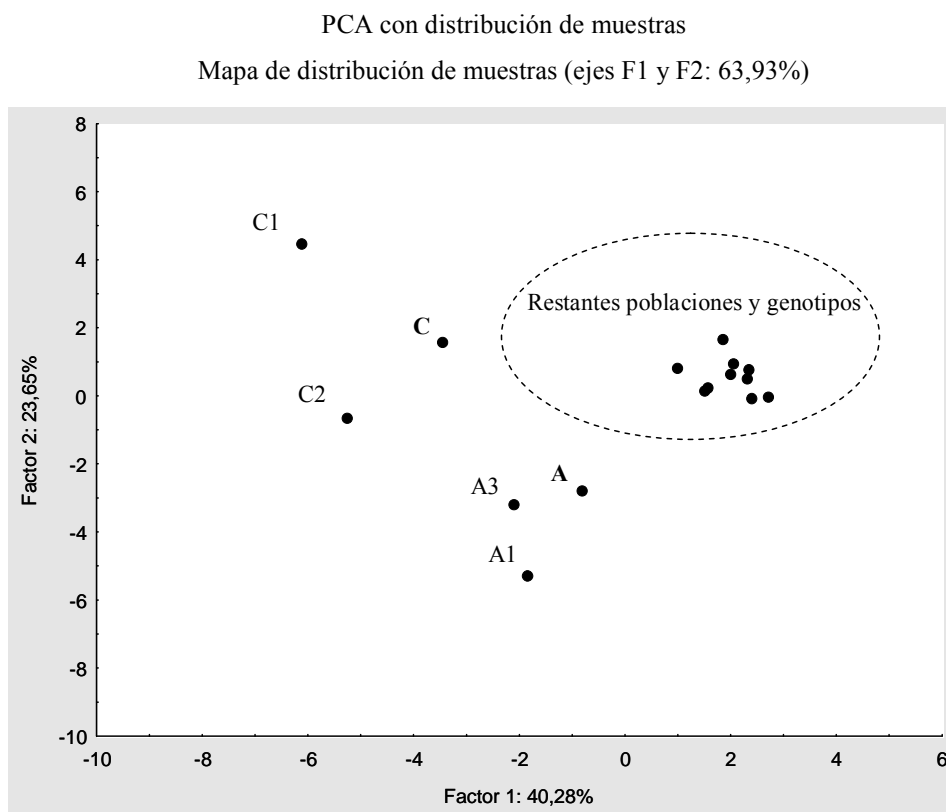


Figura 11.- Diagrama con los dos primeros componentes (F1 y F2) de un análisis PCA de las poblaciones e individuos analizados de *S. lavandulifolia*. Las letras en negrita indican la posición de las muestras a nivel poblacional.

Los tres primeros componentes extraídos del análisis acumulan una varianza del 79,84%. Se representa en la figura 11 los dos primeros componentes que, en este caso, acumulan una varianza del 63,93%. El componente F1 está positivamente correlacionado con el contenido en 1,8-cineol (0.965) y negativamente con *trans*-cariofileno (-0.881), mientras que el componente F2 está negativamente correlacionado con el nivel de alcanfor (-0.872). Se aprecia que dentro de las poblaciones A y C uno de los pies seleccionados expresa una composición química distinta en su aceite esencial a

la que daríamos como característica si únicamente analizáramos la esencia a nivel de población. Así, las plantas denominadas como A2 y C3 tienen un perfil químico en su esencia que las agrupa con el resto de muestras analizadas y, por lo tanto, las aleja del resto de ejemplares A y C. Los pies situados en las poblaciones B y D, junto con los citados genotipos A2 y C3, expresan esencias caracterizadas especialmente por su alto contenido en 1,8-cineol, en comparación con el resto de muestras analizadas. Las muestras de la población A, excluyendo al individuo A2, se caracterizan por su alto contenido en alcanfor y limoneno. La población en que más heterogeneidad se muestra en relación a la composición química de los aceites esenciales es la población C. En ésta, cada uno de los tres individuos analizados tiene características propias en la esencia que lo hacen marcadamente diferente al resto. Así, el genotipo C1 se caracteriza por su alto contenido en linalol, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno y, especialmente, en espatulenol. Este compuesto, cuando aparece en otras muestras, sólo lo hace en forma de trazas. Sin embargo, en este individuo llega a representar más de un 18% de la composición química de su aceite esencial. El individuo C2 comparte con su próximo C1 el alto contenido en sesquiterpenos como el *trans*-cariofileno y el óxido de cariofileno, pero sólo expresa el compuesto espatulenol en proporciones traza. Este individuo comparte con A3 su alto contenido en limoneno. Los individuos C1 y C2, además, tienen como marcada diferencia respecto al resto su escaso contenido en 1,8-cineol, que en ninguno de los casos supera el 5%, cuando en el resto de muestras llega a representar hasta un 49% de la esencia. Además, el individuo C1 es el único en que la fracción predominante en el aceite esencial es la sesquiterpénica.

El Análisis de Conglomerados (CA) expone de manera clara a los individuos A1, A3, C1 y C2 en clados separados del resto (figura 12). Debido a las diferencias en la composición química, la distancia entre estos individuos es mayor entre sí que entre cualquiera de los restantes. Así, cuando estos cuatro individuos ya se han separado en clados diferenciados, el resto sigue formando un único grupo que sólo se separa cuando la distancia entre ellos sigue disminuyendo. Llamativo es el caso de los individuos A2 y D2, que siendo de poblaciones distintas y, además, muy distanciadas entre sí y situadas en pisos bioclimáticos distintos, presentan una composición química en su esencia extraordinariamente similar. El individuo C3 también se encuadra junto con ejemplares de orígenes geográficos muy distintos al que le corresponde.

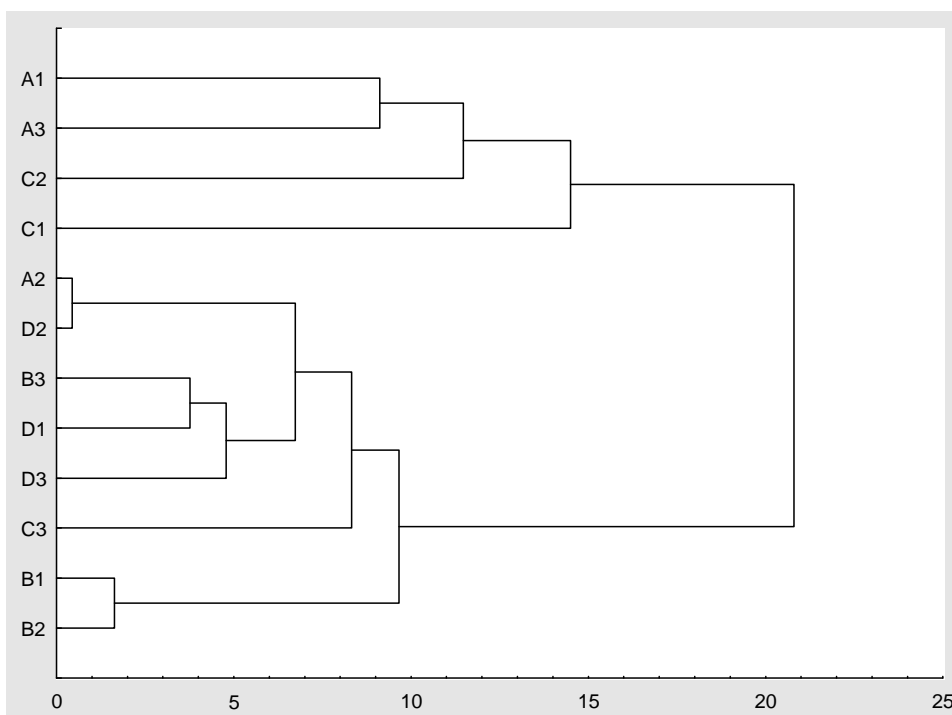


Figura 12.- Análisis de conglomerados de los doce genotipos seleccionados de *S. lavandulifolia* utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre genotipos.

Por lo tanto, debido a la heterogeneidad en la composición química de las esencias puesta de manifiesto dentro de las poblaciones C y A, aunque dentro de esta última en menor medida, el estudio de la diversidad química de esta especie a nivel poblacional resulta deficiente a la hora de definir y caracterizar los aceites esenciales. No obstante, no sería así para las poblaciones B y D, donde un estudio poblacional podría definir con bastante precisión la composición química debido a la relativa homogeneidad que presentan los individuos analizados.

La norma UNE 84310 está referida a la calidad del aceite esencial de la salvia española (*Salvia lavandulifolia* Vahl.). Comparando los resultados obtenidos con los compuestos que son normativos, se aprecia gran variabilidad en el grado de adecuación a los rangos predeterminados por norma (tabla 9). Además, en comparación con la norma, el compuesto acetato de sabinilo no ha sido detectado en ninguna de las muestras analizadas. No obstante, existe mayor grado de cumplimiento proporcional en los parámetros descritos cuando se analizan las poblaciones que cuando se analizan las plantas individualmente. Cabe destacar, el caso del 1,8-cineol, que siendo el compuesto



descrito como mayoritario en el aceite esencial de esta especie y teniendo un rango admisible en porcentaje relativo del 11-30%, únicamente 2 de los individuos analizados cumplen esa proporción en sus esencias en el momento en que fueron recolectadas. Aunque el grado de cumplimiento de la norma es mayor a nivel poblacional, como se ha puesto de manifiesto con anterioridad, a ese nivel de estudio los resultados pueden resultar poco precisos debido a la mezcla de posibles individuos con grandes diferencias en la composición química de sus aceites esenciales, además de depender el resultado del número de individuos recolectados.

Tabla 9.- Comparación entre porcentajes relativos descritos en la norma UNE 84310 con la prospección realizada a nivel inter e intrapoblacional de *S. lavandulifolia*.

Compuestos	Rango UNE	Rango intrapoblacional	Rango interpoblacional
$\alpha$ -pineno	4-11	0,4-11 (6)	2,7-9,6 (19)
sabineno	0,1-3	0,1-4,7 (4)	0,1-3,6 (19)
limoneno	2-5	1,6-17,8 (9)	2,8-12,3 (5)
1,8-cineol	11-30	1,1-55,5 (2)	15,2-53,4 (14)
linalol	0,3-4	0,1-2,3 (5)	0,1-2,6 (4)
alcanfor	15-36	0,5-24,3 (1)	1,9-28,6 (10)
borneol	1-5	0,2-4 (9)	1,2-6,8 (18)
terpinen-4-ol	< 2	0,1-0,5 (todos)	0,4-1,2 (todos)
acetato de linalilo	0,1-5	0,1-0,5 (todos)	0,1-0,9 (todos)
acetato de $\alpha$ -terpenilo	0,5-9	0,1-3,4 (3)	0,1-1,5 (8)
acetato de sabinilo	0,5-9	n.d	n.d

Nota-El perfil cromatográfico es normativo.

n.d. (compuesto no detectado); entre paréntesis el número de muestras (individuos y poblaciones) que se ajustan a la norma UNE 84310 de calidad del aceite esencial de *S. lavandulifolia*. El número de individuos analizados es de 12 y el de poblaciones de 22.

Por último, para evaluar como pueden afectar algunos factores ambientales a la heterogeneidad descrita en la composición química de los aceites esenciales, se han puesto de manifiesto las posibles correlaciones entre la composición química y el contenido de materia orgánica, nitrógeno, potasio y fósforo del suelo. Se han seleccionado estos parámetros edafológicos debido a que son los más comunes a la hora de aplicación como abonado en cultivos. Los resultados detallados de los análisis edafológicos de las cuatro poblaciones referidas de *S. lavandulifolia* se exponen en el ANEXO II.

Tabla 10.- Estructura de correlación canónica entre los principales compuestos del aceite esencial de *S.lavandulifolia* y la cantidad de materia orgánica, nitrógeno, potasio y fósforo del suelo.

Compuestos (set 1)	Estructura del factor	Peso canónico	Factores edáficos (set 2)	Estructura del factor	Peso canónico
$\alpha$ -pineno	0,353	0,844	materia orgánica	0,794	-10,795
$\beta$ -pineno	0,409	-0,758	nitrógeno	0,781	12,926
limoneno	-0,293	-0,338	potasio	0,450	-1,939
1,8-cineol	0,694	2,856	fósforo	0,893	0,379
alcanfor	0,146	1,300			
<i>trans</i> -cariofileno	-0,573	2,199			
Eingenvalues	0,937				
Correlación canónica	0,968				
Lambda	0,0013				
$\chi^2$	36,28				
Grados de libertad	24				
p-valor	0,051				
Varianza acumulada (%)					
de factores edáficos			56,08		
de factores edáficos-compuestos			20,17		

El análisis de correlación canónica entre estos dos tipos de variables indica cierta correlación entre el contenido de 1,8-cineol y el de materia orgánica, nitrógeno y fósforo (tabla 10). Así, las poblaciones con individuos con un mayor contenido en 1,8-cineol, es decir, las poblaciones B y D, son las que viven en suelos con mayor contenido de materia orgánica, nitrógeno y fósforo. No obstante, los anteriormente mencionados individuos C3 y A2, aún desarrollándose en suelos pobres en materia orgánica y escasa cantidad de nitrógeno y fósforo, presentan porcentajes relativos altos de 1,8-cineol en sus aceites esenciales y comparables a los descritos para las poblaciones B y D.

#### IV.1.4. Discusión

El polimorfismo que caracteriza a la especie *Salvia lavandulifolia* Vahl. y a otras especies de PAM se produce tanto en la biosíntesis de los aceites esenciales (rendimiento) como en su composición química (Nemeth, 2005; Schmiderer *et al.*, 2008). La diversidad, tanto en la producción como en la composición química de los aceites esenciales a nivel infraespecífico, ha sido ampliamente descrita, particularmente en especies de *Lamiaceae* (Novak *et al.*, 2000 y 2002; Echeverrigaray *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004). Particularmente, han sido objeto de estudio especies de esta misma familia que comparten hábitat con la salvia española. Así, poblaciones ibéricas de espliego (*Lavandula latifolia*) (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007) o de tomillos (*Thymus* sp.) (Sáez, 1999; 2001; Horwarth *et al.*, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2008) han sido prospectadas y caracterizadas químicamente por sus aceites esenciales. Este polimorfismo intraespecífico también ha sido observado en especies pertenecientes a otras familias botánicas: *Achillea* sp. (Rahimmalek *et al.* 2009, Franz & Novak, 2010), *Pimenta pseudocaryophyllus* (Paula *et al.*, 2011), *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* (Cavaleiro *et al.*, 2001), etc. La producción de aceite esencial, por tanto, es un hecho muy variable en todas las especies de plantas aromáticas (McGimpsey *et al.*, 1994; D'Antuono *et al.*, 2000). Esta variabilidad en las poblaciones naturales tanto en la biosíntesis de los aceites esenciales como en su composición química, también se pone de manifiesto en la salvia española.

En este estudio, un total de 22 poblaciones del centro peninsular fueron prospectadas. Para minimizar el posible efecto del estado fenológico de la especie en el momento de la recolección, ésta se realizó en el mismo estadio para todas ellas. Tanto de las plantas individuales como de las poblaciones se evaluaron la producción de esencia y la composición química. En cuanto a la producción, los rangos entre poblaciones van desde 0,6% hasta un máximo de 1,8% (figura 7). La producción de esencia no parece estar relacionada con el piso bioclimático en el que se encuentran las poblaciones analizadas, ya que poblaciones encuadradas en el mismo piso bioclimático expresan distintas producciones de aceite esencial. Similar variabilidad dentro de un mismo hábitat se pone de manifiesto en otras especies de plantas aromáticas como el espliego (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007). Las plantas de una misma población también difieren en cuanto a la producción de aceite esencial. En este caso, cuando se analizan plantas individuales, el rango de variación encontrado es mayor que a nivel poblacional,

llegando a encontrar individuos con rendimientos superiores al 3% en algún momento de su ciclo biológico.

Recolectando ese mismo material vegetal en diferentes épocas del año se aprecia que no hay diferencias significativas en cuanto al rendimiento conforme al estado fenológico de las plantas. Sin embargo, y a pesar de no existir dichas diferencias en rendimiento, no todos los genotipos muestran el mismo patrón de producción (figura 8). La mayoría de trabajos de prospección de poblaciones naturales para evaluar la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales, recolectan el material vegetal en época de floración. Las plantas de las poblaciones B y C tienen rendimientos altos en época de floración (junio), cayendo posteriormente, mientras que en las poblaciones A y D los rendimientos en floración son mucho más variables dependiendo de la planta (aunque suele aumentar después de la floración). Estudios con otras especies como *Origanum vulgare* (D'Antuono *et al.*, 2000), *Calendula arvensis* (Paolini *et al.*, 2010) o *Lavandula latifolia* (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007), por citar algunas, muestran que cuando se extraen por separado los aceites esenciales de hojas y flores, en la mayoría de los casos el rendimiento es mayor en las flores. No podemos afirmar lo mismo para la salvia española debido a la irregularidad de los datos de rendimiento obtenidos en el mes de junio (que corresponde con la época de floración) (figura 8). Aunque las diferencias son apreciables en cuanto al rendimiento en aceite esencial dentro de individuos de una misma población, éstas son sólo significativas a nivel interpoblacional (tabla 6). Las diferencias en la producción de aceite esencial son atribuibles a las distintas poblaciones y no se pueden describir genotipos con mayor capacidad de producción de esencia que el resto. Esto indica que las condiciones bioedafo-climáticas imperantes en cada una de las poblaciones puede tener una influencia relevante en cuanto al rendimiento en aceite esencial biosintetizado. Sin embargo, estos resultados contrastan con los descritos para el espliego (*Lavandula latifolia*), donde las diferencias en el rendimiento tanto en hojas como en flores son significativas a nivel interpoblacional e intrapoblacional (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007). Además, en el citado estudio se destaca que la varianza atribuida a las plantas individuales es, en ambos casos, mayor que la atribuida a las diferentes poblaciones evaluadas. Estos datos vienen de una sola recolección, mientras que los descritos en este trabajo provienen de tres repeticiones a lo largo del año. Los tricomas glandulares que producen y almacenan el aceite esencial se distribuyen por todas las superficies aéreas de la planta. Sin embargo, la mayor densidad de estas glándulas se produce en el envés de las hojas. Por

lo tanto, a la hora de realizar ejercicios comparativos de producciones es conveniente tener en cuenta que la relación tallos/hojas/flores sea equivalente. Si no es así, este hecho puede dar lugar a comparaciones incorrectas.

En todos los casos, los compuestos con mayores porcentajes relativos son el 1,8-cineol o el alcanfor. Con respecto a la composición química, los compuestos mayoritarios detectados en las poblaciones de *S. lavandulifolia* son, en su mayoría, los mismos descritos por otros estudios previos (Guillén *et al.*, 1996; Giannouli & Kintzios, 2000; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010) para esta especie. Algunos de los compuestos mayoritarios que forman parte de estos aceites esenciales son frecuentes en los aromas florales y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

Las poblaciones naturales fueron agrupadas conforme a la composición química de sus aceites esenciales mediante análisis descriptivos multivariantes. La distribución que ofrece la figura 9 agrupa las poblaciones según su origen geográfico. Así, las poblaciones de la comarca de La Alcarria forman el denominado grupo I, las poblaciones de la Serranía de Cuenca forman el grupo II y, por último, las poblaciones localizadas al sur de éstas, en otros sistemas montañosos, conforman el grupo III. Por lo tanto, existe concordancia respecto al origen geográfico y la composición química de los aceites esenciales. Esta hipótesis de distribución geográfica ha sido propuesta para otras especies cuando se han realizado estudios prospectivos a nivel poblacional para evaluar la diversidad en la composición química de los aceites esenciales (Adams *et al.*, 2006; Agostini *et al.*, 2006), incluso proponiendo que el estudio del hábitat puede ser usado como herramienta de predicción en la variación del aceite esencial de una especie determinada (Karousou *et al.*, 2005). Conforme a los análisis descriptivos multivariantes, las poblaciones se distribuyen de singular manera (figuras 9 y 10). Todas las poblaciones de la comarca de La Alcarria forman un grupo homogéneo caracterizado, principalmente, por el contenido medio-bajo de 1,8-cineol y un alto contenido de canfeno y alcanfor. El grupo formado por las poblaciones B, C y D proviene de hábitats forestales. Las esencias de estas poblaciones se caracterizan por el gran contenido en 1,8-cineol, que llega a representar más de la mitad de los compuestos identificados en sus aceites esenciales. Estos porcentajes se sitúan en los rangos más altos descritos para la subespecie *lavandulifolia* por Marcos *et al.* (1988). Sin embargo, las poblaciones del restante grupo (Grupo III en Almería, Murcia y Albacete), a pesar de ser igualmente de áreas montañosas y hábitats de bosque, la composición química mostrada por los aceites esenciales es sustancialmente distinta. En este caso, el

contenido en 1,8-cineol es más bajo y el de alcanfor más alto. Tal situación podría tratarse de una subespecie distinta, aunque al ser los valores referencia descritos por Marcos *et al.* (1988) poco precisos para éstos y otros compuestos y sin haber realizado un examen morfológico de las poblaciones, no es posible afirmarlo. El análisis de conglomerados (figura 10) muestra una distribución básica en dos grupos. Esta distribución se conforma en base al contenido de 1,8-cineol y alcanfor, los compuestos con mayor porcentaje relativo.

El rango descrito para el 1,8-cineol es de 15,2-53,4% y el del alcanfor es de 1,9-28,6%. Otros estudios prospectivos de material vegetal en época de floración, como los desarrollados por Herraiz-Peñalver *et al.* (2010) muestran, en general, valores más bajos de 1,8-cineol. Otros autores, esta vez con material cultivado y recolectado también en floración, confirman este hecho (Guillén *et al.*, 1996). Los altos porcentajes relativos de 1,8-cineol encontrados en esta prospección pueden ser debidos a que la recolección se realizó en invierno, cuando la actividad metabólica de las plantas era todavía baja. Este compuesto se acumula principalmente en las hojas de *Lavandula angustifolia* y mayoritariamente en los estadios de prefloración, donde sus porcentajes relativos van decreciendo según maduran las flores, en las cuales se van acumulando otros compuestos como el linalol (Guitton *et al.*, 2010).

Las prospecciones en época de escasa actividad metabólica muestran unos aceites esenciales con predominancia clara de los monoterpenos, que en todos los casos salvo en la población *Al* (Almería) están por encima del 80% del total. Ésta sigue siendo la fracción predominante en época de floración en las poblaciones naturales, aunque con porcentajes más bajos. El alcanfor ha sido propuesto como indicador de posibles quimiotipos en ésta y otras especies. Además, se ha descrito una ligera tendencia a aumentar los contenidos de 1,8-cineol y alcanfor y a disminuir el de  $\alpha$ -pineno en los aceites esenciales con el incremento de la edad de las plantas (Burillo, 2003). Los niveles de alcanfor son mayores en poblaciones de la comarca de La Alcarria en comparación con los de la comarca de La Serranía. Estas primeras poblaciones se desarrollan en ecosistemas de matorral con alta exposición solar y, por lo tanto, con una alta actividad fotosintética. El alcanfor se produce tras una oxidación del borneol, proviniendo éste de una hidratación del carbocatión bornilo (Sell, 2010). Por lo tanto, factores como la humedad y la actividad fotosintética pueden tener un papel relevante en la formación de ambos compuestos.

Este estudio de evaluación de la diversidad química de los aceites esenciales en poblaciones naturales se extendió a nivel de plantas individuales. El patrón químico resultante para una población determinada depende del número de individuos que se haya utilizado para ello, siendo una mezcla aleatoria de uno o varios de ellos, un procedimiento no apto para la conformación de perfiles químicos. Con números bajos de individuos analizados los valores medios experimentan una gran oscilación, y sólo después de analizar la suma de 15-20 individuos los rangos de variación son aceptables (Franz & Novak, 2010).

Analizando plantas individuales dentro de las poblaciones se obtiene una gran variabilidad en la composición química de los aceites esenciales. En este caso, el número de compuestos de carácter mayoritario es mayor que a nivel poblacional. Mientras que en las poblaciones los compuestos con mayores porcentajes relativos eran siempre el 1,8-cineol o alcanfor, en este caso, aparecen los compuestos *trans*-cariofileno y espatulenol como los de mayor porcentaje en dos muestras. Se da la circunstancia que el compuesto espatulenol fue detectado únicamente en 5 muestras.

La distribución de los ejemplares conforme a sus perfiles químicos muestra una marcada heterogeneidad intrapoblacional. Dentro de las poblaciones A (Torralba) y C (Huélamo), existen genotipos con grandes diferencias en la composición química de los aceites esenciales. Sin embargo, los individuos de las poblaciones B (Campillo-Paravientos) y D (Huerta del Marquesado) producen aceites esenciales muy homogéneos (figura 11). Con estos resultados podemos intuir que un estudio poblacional sólo sería apto para determinar los perfiles químicos de las poblaciones B y D. Debido a la gran diversidad química, un estudio poblacional para A y C no determinaría un perfil químico representativo, ya que son diversos los quimiotipos que integran estas poblaciones. Sin embargo, para afianzar estas conclusiones se debería aumentar el número de ejemplares analizados. Como resumen, 5 grupos pueden diferenciarse de las 12 plantas individuales analizadas de 4 poblaciones de la provincia de Cuenca (figura 12 y tabla 11).

Otros resultados similares respecto a variación química *planta a planta* en poblaciones naturales se han observado en especies como *Achillea* sp. (Rauchensteiner *et al.*, 2004) o *Matricaria recutita* (Franz, 2000; Taviani *et al.*, 2002). Franz & Novak (2010) describen hasta 4 quimiotipos distintos en *Thymus vulgaris* dentro de una misma población. En las plantas aromáticas la evaluación de numerosos individuos o poblaciones es una necesidad ineludible. Se puede afirmar, a la vista de los resultados

descritos y de otros estudios, que es casi imposible lograr dos aceites esenciales idénticos en su composición química. Este hecho es debido, principalmente, al grado de sensibilidad analítica con el que se haya trabajado, la época de recolección, los individuos analizados e incluso el método de extracción.

Tabla 11.- Grupos de genotipos de *S. lavandulifolia* diferenciados conforme a la composición química de los aceites esenciales.

Grupo	Población (Genotipos integrantes)	Composición química
I	Población A (A2) Población B (B1,B2 y B3) Población C (C3) Población D (D1,D2 y D3)	Alto contenido en 1,8-cineol (>40%), bajo de alcanfor (<6%)
II	Población A (A1)	Contenido medio de 1,8-cineol y muy alto de alcanfor (~25%).
III	Población A (A3)	Contenido medio de 1,8-cineol y muy alto de limoneno (~18%). Contenidos altos de $\alpha$ -pineno y <i>trans</i> -cariofileno.
IV	Población C (C1)	Espatulenol como principal compuestos (~18%). Sesquiterpenos como grupo mayoritario (>60%).
V	Población C (C2)	Limoneno (~14%) y <i>trans</i> -cariofileno (~17%) como principales compuestos. Alto contenido en óxido de cariofileno (~8%).

Existe una normativa nacional e internacional sobre la composición química de los aceites esenciales para numerosas especies de plantas aromáticas y medicinales. Estas normas detallan perfiles cromatográficos para los aceites esenciales. La tabla 9 indica la baja coincidencia en cuanto al perfil cromatográfico requerido por la normativa y el encontrado en las poblaciones naturales. Ninguno de los genotipos estudiados cumple la normativa estatal UNE para todo el perfil cromatográfico. Además, la coincidencia analizando únicamente los dos compuestos descritos como mayoritarios (1,8-cineol y alcanfor) es llamativamente baja, con 2 y 1 genotipos que encajan en la norma, respectivamente. Otras prospecciones con espliego (*Lavandula latifolia*) en la Península Ibérica constatan, de igual modo, la discordancia entre lo establecido como patrón de calidad del aceite esencial y lo que se describe en las poblaciones naturales



(resultados personales sin publicar). Esta normativa pretende abarcar un perfil de calidad para el aceite esencial. A la luz de nuestros resultados y de otros trabajos, este perfil de calidad no se ajusta a la quimiotaxonomía de la especie (Guillén *et al.*, 1996; Schmiderer *et al.*, 2008; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010). Esto pone de manifiesto la necesidad de poner en marcha proyectos de selección y mejora en relación a la composición química de sus aceites esenciales. Los estudios a nivel poblacional deben ser el punto de partida de estudios posteriores para determinar genotipos concretos de trabajo. Ésta debe ser la estrategia para iniciar procesos de selección y mejora de estas especies de interés comercial.

Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que las diferencias en cuanto al rendimiento en aceites esenciales sean significativas a nivel de las poblaciones naturales, indica un posible papel condicionante del ambiente en este sentido. El análisis de correlación canónica entre los compuestos mayoritarios del aceite esencial y los componentes del suelo (medidos como % de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio) revela una correlación positiva entre el contenido en 1,8-cineol y el % de materia orgánica en el suelo. Aunque existen evidencias de un fuerte control genético sobre los quimiotipos medido como composición química de sus aceites esenciales (Franz & Novak, 2010), existen diversas referencias de revisión sobre la influencia que tienen factores ambientales como la radiación, temperatura, nivel de precipitaciones, o enfermedades y plagas sobre la composición química de los aceites esenciales (Sangwan *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2008; Barra, 2009). Concretamente, factores genéticos y edafológicos son los que parecen determinar la composición química de los aceites esenciales en poblaciones de *Thymus caespitius* (Pereira *et al.*, 2000) o en poblaciones de *Eryngium campestre* L., donde los suelos ácidos favorecen el contenido en monoterpenos (Palá-Paúl *et al.*, 2008). La aplicación de algún tipo de fertilización al suelo generalmente afecta a la producción de esencia debido a que aumenta la producción de material vegetal por hectárea cultivada. A pesar de la existencia de correlación positiva entre la cantidad de 1,8-cineol y el de materia orgánica del suelo entre los individuos analizados, existe todavía un gran porcentaje de variabilidad que debe ser objeto de nuevos estudios.

En relación a un posible polimorfismo físico, no se han detectado diferencias morfológicas dentro de los ejemplares de las poblaciones. En este estudio, de los grupos descritos en la tabla 11, no puede concluirse la existencia de quimiotipos, ya que las plantas de las diferentes poblaciones se desarrollaron en los ambientes propios. Sin

embargo, los individuos de las poblaciones A y C, donde las diferencias en cuanto a la composición química de los aceites esenciales son evidentes desarrollándose bajo unas mismas condiciones, podrían ser descritos como posibles quimiotipos. Las modificaciones debidas al ambiente y el estudio detallado de la evolución en la composición química en relación al estado de desarrollo y de las diferentes partes de las plantas deben ser factores a analizar cuando se describen quimiotipos (Franz, 1993; Barra, 2009).

En resumen, la variabilidad química encontrada en las poblaciones naturales de la salvia española puede usarse para determinar quimiotipos concretos de interés agrícola y comercial. La correlación existente entre la influencia que tienen los factores ambientales y la constitución genética individual, determinará la posibilidad y posterior efectividad de procesos de selección y mejora de esta especie para usos comerciales.

## **IV.2. SEGUIMIENTO FENOLÓGICO DE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE DIVERSOS CLONES DE *S. lavandulifolia* Vahl.**

### **IV.2.1. Introducción**

Diferentes especies de plantas aromáticas y medicinales cultivadas o cosechadas bajo recolección silvestre, entre ellas algunas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*, están siendo investigadas actualmente en España. El principal objetivo de estas investigaciones es conocer la diversidad fitoquímica que presentan estas especies y satisfacer así los requerimientos de aceites esenciales y extractos que demandan las industrias. El romero (*Rosmarinus officinalis* L.), el espliego (*Lavandula latifolia* L.), los tomillos en general (*Thymus* sp.), o la salvia española (*Salvia lavandulifolia* Vahl.), son algunas de estas especies.

Los polimorfismos descritos para muchas especies están condicionados por numerosos factores (Bourgaud *et al.*, 2001; Hadacek, 2002; Barra, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008). En resumen, los factores que influyen en la producción y composición química de los aceites esenciales que producen las plantas son, en primer lugar, factores fisiológicos como el tipo de estructura secretora, el estado de desarrollo de la planta, la incidencia de plagas y/o enfermedades o la parte de la planta que se utilice como materia prima (hojas, flores, tallos, etc.). En segundo lugar, las condiciones ambientales entendidas como la incidencia que pueda tener la temperatura, la pluviometría o los factores edáficos. En tercer lugar, factores genéticos o evolutivos que, a la postre, determinarán los quimiotipos. Y por último, otra serie de factores de ámbito cultural o que tienen que ver con el manejo de las plantas como son, las labores de cultivo, la forma de almacenaje de materias primas o los métodos extractivos utilizados. En la naturaleza, la superposición de la influencia de algunos de estos factores dificulta la evaluación del efecto de cualesquiera de ellos. Sin embargo, para conseguir homogeneidad y continuidad en la producción es necesario conocer la incidencia real de los mismos en la expresión del metabolismo secundario de las especies de interés comercial.

En muchas especies de interés agronómico, la composición química de los aceites esenciales varía a lo largo del año y, por lo tanto, este conocimiento resulta esencial desde un punto de vista económico. La formación de los aceites esenciales

depende, en gran medida, de la diferenciación tisular de la planta (lo que condiciona el tipo de estructura de secreción) y de la fase del ciclo vegetativo en que se encuentre. En general, la producción de aceites esenciales y los productos del metabolismo secundario, se puede considerar muy dependiente de las condiciones ambientales.

El conocimiento de estos condicionantes en cada especie cultivada es necesario para que la cosecha se realice en el momento más indicado y para que se aprovechen las partes de la planta que satisfacen las necesidades del mercado. En muchos casos, existe un incremento en la producción de aceite esencial en algún momento del desarrollo vegetativo o con la edad de la planta. Especialmente, se han observado en algunas especies grandes diferencias en cuanto a producción y composición química de los aceites esenciales desde la formación de las primera flores hasta la completa floración de la planta o hasta la formación de los frutos y semillas (Marotti *et al.*, 1994; Gora *et al.*, 2002; Coronel, 2006; Guitton *et al.*, 2010). Existen numerosos estudios sobre variaciones estacionales de aceites esenciales en la familia *Lamiaceae* donde se muestran grandes diferencias en el contenido y composición química de los aceites esenciales en hojas jóvenes y maduras, además de en las flores, donde puede variar significativamente la calidad del aceite esencial obtenido (Werker *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 2004; Angioni *et al.*, 2006). En general, los mayores rendimientos se suelen alcanzar durante el periodo de floración, lo que lleva a que la mayoría de las esencias provengan de plantas cosechadas durante en esta fase. Casos concretos son los de los cultivos de las lavandas (*Lavandula* sp.) o el hisopo (*Hyssopus officinalis* L.), donde la producción de aceite esencial en cuanto a rendimiento y calidad es considerado más alto cuando la planta está en plena floración (Zheljazkov *et al.*, 2008; Guitton *et al.*, 2010).

El cultivo de *S. lavandulifolia*, aún siendo catalogado a nivel global entre los importantes dentro de las plantas productoras de aceites esenciales, tiene una cuota de mercado con una estimación de producción menor de 100 toneladas por año, considerándose minoritaria (Franz & Novak, 2010). El cultivo de esta especie se encuentra lastrado por diversas causas. Por un lado, la mayoría de los cultivares provienen de material vegetal sin seleccionar, directamente de poblaciones naturales. Este hecho dificulta enormemente la obtención de productos homogéneos o con cierta trazabilidad. Además, ésta es una especie que llega a tener un porte muy rastrero, lo cual impide, en muchos casos, una correcta recolección mecanizada. Por otro lado, no existen estudios completos sobre el comportamiento de esta especie en cultivo que

ayuden a determinar rendimientos óptimos o épocas de cosecha adecuadas, además de su respuesta frente a factores como la pluviometría, la temperatura, los fitopatógenos, etc. La falta de datos de rendimientos y calidades en los aceites esenciales de esta especie a lo largo de todo su ciclo productivo, junto con el desconocimiento de las prácticas culturales necesarias para su correcto desarrollo y su incidencia en la calidad, son aspectos que limitan actualmente su consolidación como cultivo alternativo en muchas zonas de España. Profundizar en dicho conocimiento es fundamental para conocer y mejorar la adaptación al cultivo y la calidad de las esencias producidas.

En este estudio se pretende determinar la incidencia real de las condiciones climáticas en la producción y composición química de los aceites esenciales y estudiar la evolución de su biosíntesis a lo largo del ciclo biológico de *S. lavandulifolia*. Para este estudio se han empleado clones procedentes de poblaciones naturales, con la finalidad de controlar la variabilidad que pudieran incluir los factores de índole genética, tanto en el rendimiento como en la composición química. Además, se pretende adquirir conocimientos sobre la respuesta de esta especie al cultivo a lo largo de todo el ciclo productivo y la incidencia en el rendimiento y calidad de los aceites esenciales de las condiciones climáticas imperantes en la zona donde se han llevado a cabo los ensayos.

Según Franz (1993), los estudios de variabilidad química de los aceites esenciales deberían tener en cuenta al menos las siguientes tres variables. La primera de ellas es la variabilidad genética del material vegetal con el que se trabaje. La segunda variable debe ser tener en cuenta las diferencias existentes en la composición química de las diferentes partes de las plantas y debido al estado de desarrollo en el momento de la recolección del material vegetal. Y la tercera y última variable a considerar son las modificaciones debidas al ambiente donde se desarrollan. En este trabajo, al contar con material reproducido vegetativamente de plantas individuales y desarrollándose todas ellas en un mismo ambiente bio-edafo-climático, se podrá evaluar entonces en qué medida las diferencias fitoquímicas encontradas en las poblaciones naturales son debidas a diferencias biogeográficas o a diferencias genéticas.

## IV.2.2. Material y Métodos

### IV.2.2.1. Selección de los genotipos para el estudio

Los genotipos seleccionados para este estudio son los mismos que han sido citados en el **Estudio IV.1.**, pertenecientes a las poblaciones de las localidades situadas en Torralba (A), Campillo-Paravientos (B), Huélamo (C) y Huerta del Marquesado (D), todas ellas en la provincia de Cuenca. De estas cuatro poblaciones se seleccionaron al azar tres plantas individuales para su multiplicación vegetativa en invernadero. De cada una de ellas se recolectó, en estado de baja actividad metabólica, la parte aérea más apical. El material vegetal recolectado se conservó individualmente en paños húmedos hasta su traslado al C.I.A de Albaladejito (Cuenca). Una vez en el centro, se procedió a su estaquillado tal y como se indica en el apartado siguiente. Además, cada uno de los genotipos recolectados fue conservado como pliego testigo y como material depositado en banco de germoplasma. La localización geográfica completa y los números de registros tanto del herbario como del banco de germoplasma se encuentran detallados en la tabla 5 del **Estudio IV.1.**

### IV.2.2.2. Multiplicación vegetativa

La multiplicación vegetativa de los pies de *S. lavandulifolia* seleccionados de las poblaciones se llevó a cabo en el invernadero de plantas aromáticas y medicinales del C.I.A de Albaladejito (Cuenca) (imagen 7). Las coordenadas geográficas del centro son 40°04'25" N 2°12'14"W. El centro se encuentra a escasos kilómetros de la ciudad de Cuenca. Este centro cuenta con una parcela de más de dos hectáreas dedicada a la investigación con diversas especies de plantas aromáticas y medicinales, además de una muestra-colección de las especies más representativas de la Península Ibérica.

Para la multiplicación vegetativa de cada uno de los genotipos seleccionados, se estaquillaron las partes aéreas apicales recolectadas. El proceso de esquejado y posterior implantación en bandejas de enraizamiento se realizó en invernadero. Las bandejas de enraizamiento fueron recipientes de forma rectangular de 123x256 cm y de una altura aproximada de 11 cm. Como soporte para los esquejes se utilizaron una capa de base o lecho compuesta por una mezcla de arena de río, turba y compost comercial, con una capa superficial de perlita, material inerte que será utilizado por las plantas

únicamente como soporte físico. Las partes apicales de las plantas esquejadas se introdujeron en las bandejas de enraizamiento hasta la mitad de su longitud, aproximadamente. Los esquejes se mantuvieron en invernadero, con un riego semanal, hasta el completo desarrollo radicular. No se aplicó tratamiento hormonal alguno para facilitar o inducir el enraizamiento. Una vez comprobado el adecuado desarrollo, los clones resultantes de la multiplicación vegetativa fueron transplantados a la parcela de cultivo.



Imagen 7.- Zona de estudio. Campos de ensayo de PAM del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca).

#### IV.2.2.3. Implantación en campo de cultivo

El material vegetal descrito en el apartado anterior fue implantado en la parcela de experimentación de plantas aromáticas y medicinales del C.I.A de Albaladejito (Cuenca). La implantación en cultivo de estas plantas se llevó a cabo cuando los sistemas radiculares estuvieron suficientemente desarrollados y aptos para su adaptación a las nuevas condiciones. Esta tarea se llevó a cabo en Octubre de 2008. El traspaso se realizó manualmente con plantas enraizadas sin cepellón, a raíz desnuda. Puntualizar que, aunque todos los experimentos descritos de ahora en adelante se

desarrollaron en condiciones de secano, se procedió a un riego de apoyo inmediatamente después del proceso de implantación con el objetivo de facilitar el arraigo de las plantas en el nuevo terreno.

El diseño de la parcela de cultivo consistió en la implantación del material vegetal por filas y, dentro de éstas, por bloques, los cuales representan cada uno de los genotipos cultivados de *S. lavandulifolia*. Así, la distancia entre filas fue de 1,8 m y entre bloques dentro de una fila, de 2 m. La distancia entre las distintas réplicas o clones que proceden de la multiplicación vegetativa de una misma planta madre fue de 0,5 m. No todos los genotipos que se implantaron en cultivo tuvieron el mismo número de réplicas. Este hecho fue debido a que el número de marras en el paso descrito de la multiplicación vegetativa en invernadero fue dispar entre ellos.

Una vez llevada a cabo la implantación, se determinó un periodo de acondicionamiento y adaptación de 1 año. Durante este periodo el cultivo sufrió nuevas pérdidas que hicieron descender el número de réplicas viables. A pesar de ello, se contó con un número suficiente de clones para que estas pérdidas de material vegetal no impidieran el normal funcionamiento y desarrollo de todos los ensayos previstos. Debido al elevado número de marras del genotipo denominado A1, tanto a la hora de la reproducción vegetativa como a la hora de la implantación y acondicionamiento a las condiciones de cultivo, éste no contó con el número de réplicas necesarias para llevar a cabo los experimentos previstos. Por lo tanto, y una vez finalizados todos los periodos descritos, se contó con 11 genotipos viables, multiplicados vegetativamente con éxito en forma de clones y bien adaptados a la condiciones de cultivo.

Una vez finalizado el periodo de acondicionamiento de los clones de *S. lavandulifolia* se procedió a la recolección periódica de material vegetal de cada uno de los 11 genotipos representados en el cultivo.

#### **IV.2.2.4. Recolección periódica de material vegetal**

Después del citado periodo de acondicionamiento y adaptación al cultivo, y eliminadas las marras detectadas durante este tiempo, se procedió a la recolección periódica de material vegetal para la extracción de los aceites esenciales mediante hidrodestilación y posterior caracterización química (Apartados de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES III.1. y III.2., respectivamente).



Tabla 12.- Número, origen e identificación de los genotipos de trabajo.

POBLACIONES ORIGEN*	Nº de genotipos de trabajo	Denominación de trabajo
Torralba (A)	2	A2, A3
Campillo-Paravientos (B)	3	B1,B2,B2
Huélamó (C)	3	C1,C2,C3
Huerta del Marquesado (D)	3	D1,D2,D3

\* La localización geográfica de las poblaciones puede consultarse en la tabla 5 del **Estudio IV.1**.

Tal y como se mencionó en el apartado anterior, 11 genotipos contaron con suficiente número de réplicas o clones para el correcto desarrollo de los experimentos. El genotipo denominado A1 fue eliminado de los ensayos debido a la falta de material vegetal. Cada una de las cosechas de material vegetal consistió en la recolección aproximada de 150 g de hojas, tallos y flores (en su caso). La recolección se efectuó a mano con la utilización de tijeras podadoras. La frecuencia de corte se estableció en dos meses. Así, durante el año 2010 se aislaron 6 muestras de aceite esencial de cada uno de los genotipos que fueron objeto de estudio. Además, durante el siguiente año 2011, otras dos muestras fueron cosechadas con el mismo fin. Los meses en que tuvieron lugar las recolecciones en ambas campañas se detallan en la tabla 13. Por lo tanto, durante dos años un total de 8 muestras de aceite esencial fueron recolectadas de cada uno de los clones de trabajo. En cada caso se aislaron los aceites esenciales, calculándose el rendimiento en aceite esencial medido como % (volumen en mililitros de esencia por cada 100 gramos de material vegetal seco destilado) y se analizó su composición química.

#### IV.2.2.5. Caracterización bio-edafo-climática

Con el objetivo de caracterizar el ambiente bio-edafo-climático en el que se desarrollaron los clones de *S. lavandulifolia* se determinaron las características edafológicas del suelo, se registraron los datos climáticos y se midió periódicamente la humedad del suelo a tres profundidades. Además, todos los ejemplares puestos en cultivo se analizaron de manera periódica desde el punto de vista de su aspecto físico en

busca de posibles patologías o plagas que pudieran afectarles (sin detectar ninguna anormalidad).

Tabla 13.- Calendario de cosechas para los genotipos cultivados de *S. lavandulifolia*.

Cosecha	MES	AÑO
1	Febrero	2010
2	Abril	2010
3	Junio	2010
4	Agosto	2010
5	Octubre	2010
6	Diciembre	2010
7	Junio	2011
8	Octubre	2011



#### IV.2.2.5.1. Características edafológicas

El suelo de la parcela donde se cultivaron los genotipos de trabajo se sometió a una completa caracterización edafológica. La metodología empleada en dichos análisis se cita en el Apartado III.3. de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES. Los resultados completos pueden consultarse en el ANEXO II. En resumen, el suelo de la parcela de cultivo es de textura franco arenosa y carácter básico, con bajo contenido en materia orgánica y nitrógeno. Se caracteriza, además, por tener contenidos muy altos de algunos macronutrientes como fósforo, potasio y calcio.

#### IV.2.2.5.2. Registro climatológico

Todos los datos climatológicos fueron registrados por una estación meteorológica situada en el C.I.A de Albaladejito (Cuenca). La estación meteorológica modelo Davis Vantage Pro2, con descarga automática de datos cada 10 minutos, permitió la toma de medidas de temperatura, humedad relativa del aire, velocidad del viento y precipitación en la parcela de cultivo donde se desarrollaron los experimentos.

El resumen de los datos climatológicos desde 2008 hasta 2011, así como los correspondientes diagramas ombroclimáticos, se detallan en el ANEXO III.

#### IV.2.2.5.3. Registro de la humedad del suelo

Como medida indirecta del estrés hídrico al que estuvieron sometidos los genotipos de *S. lavandulifolia* durante su mantenimiento en cultivo se midió, mediante sondas, la humedad de la parcela. Los sensores de humedad conectados a un registrador de datos para el almacenamiento de lecturas modelo *Watermark* se instalaron a tres profundidades (a 10, 30 y 40 cm de la superficie) en distintos puntos de la parcela de ensayo. Los sensores fueron programados para realizar lecturas cada 2 horas. Los datos fueron descargados periódicamente, con un máximo de 20 días para evitar la pérdida de información. Debido al gran volumen de datos tomados por las tres sondas instaladas, en este caso los resultados se presentan en forma de gráfica, donde se aprecia la evolución con el tiempo de la media de la humedad del suelo, medida como VWC (contenido volumétrico de agua).

#### IV.2.2.6. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa STATISTICA 6.0 (Statsoft, 2001). La significación en la variación de los rendimientos y porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios entre los distintos genotipos de trabajo se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Con la idea de formar grupos de tratamiento equivalentes se realizaron comparaciones múltiples entre los grupos de tratamiento (época de recolección y genotipo) mediante contrastes de Tukey (HSD). Además, un nuevo ANOVA encajado se ha llevado a cabo para estimar, bajo estas nuevas condiciones, los componentes de la varianza para el rendimiento en aceite esencial, dividiendo la variación entre poblaciones y entre individuos dentro de una misma población de origen. Previa a su aplicación, la normalidad de las poblaciones y su homocedasticidad fueron evaluadas mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente.

Por otro lado, al igual que en **Estudio IV.1.**, se ha empleado el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de conglomerados (CA) con el objetivo

de generar hipótesis sobre las relaciones en cuanto a la composición química entre los individuos analizados a lo largo de su ciclo vegetativo.

Para identificar grupos de terpenos con patrones similares en su evolución durante el ciclo vegetativo de la especie, se utilizaron correlaciones por pares de componentes utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. La significación de las correlaciones por pares de componentes fue evaluada después de efectuar la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Como resultado se obtuvo una matriz de correlación por pares representada gráficamente por un cuadro de colores. Los colores indican el grado y el signo de la significación de los pares de compuestos.

Finalmente, como método para la validación de la posible presencia de quimiotipos entre los genotipos de trabajo se ha utilizado el descrito por Soria *et al.* (2008). Este método utiliza como hipótesis nula la suposición de que la tendencia de los datos experimentales a formar dos grupos de distinta concentración es la que cabría esperar de una distribución normal. Como método para la obtención de grupos se ha utilizado el de agrupación de k-medias, y como medida de separación entre grupos la distancia de Mahalanobis, cuyo valor para los datos experimentales se compara con los calculados para distribuciones normales de referencia obtenidas mediante simulación. Si de acuerdo con esta comparación se rechaza la hipótesis, la agrupación puesta de manifiesto en los datos experimentales no es debida a causas aleatorias y es posible defender la existencia de quimiotipos.

#### **IV.2.3. Resultados**

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante los estudios de seguimiento y monitorización de la producción y composición química de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* a lo largo de todo un ciclo anual. En este trabajo, se han utilizado clones de esta especie para determinar las variaciones fitoquímicas a lo largo de su ciclo vegetativo. Además, un mismo ambiente de crecimiento puede permitir determinar el grado de fijación de los polimorfismos químicos descritos en las poblaciones naturales.

A continuación, se exponen por separado los resultados referidos al rendimiento en aceite esencial y a la composición química. El último apartado recoge los resultados obtenidos en relación al estrés hídrico medido a través de sondas de humedad.

#### IV.2.2.1. Rendimiento en aceite esencial

Los valores de rendimiento en aceite esencial de cada uno de los clones o genotipos evaluados durante el año 2010 aparecen en la tabla 14. En esta tabla se representa la dinámica en la producción de esencia a lo largo del ciclo anual de la especie. En relación al material vegetal, la mayor media encontrada (de todo el ciclo productivo) es de 1,29% y la menor de 0,74%, que corresponden a los genotipos B3 y C1/A3, respectivamente. En cuanto a la variación anual del rendimiento en aceite esencial, la mayor media encontrada (por fecha de recolección) es de 1,74% y la menor de 0,45%, que corresponden a los meses de septiembre-octubre y marzo-abril, respectivamente. En comparación con lo establecido en las poblaciones naturales, un ANOVA encajado (tabla 15) indica que, bajo unas mismas condiciones, no existen diferencias en cuanto al rendimiento en aceite esencial entre los genotipos de trabajo en relación al origen geográfico en las poblaciones naturales. Sin embargo, existe una gran significación con respecto a la época del año en que se ha evaluado la cantidad de aceite esencial producido ( $F=12,96$ ;  $p<0,001$ ).

Un test Tukey HSD de comparaciones múltiples *post hoc* (tabla 16) indica que los meses de septiembre-octubre deben estar encuadrados en un grupo de tratamiento aparte por tener una producción de aceite esencial significativamente mayor que el resto de los meses del año.

Tabla 14.-Rendimiento en aceite esencial (%) de los clones de *S.lavandulifolia* evaluados durante el año 2010.

CLON	Época de recolección						
	Enero Febrero	Marzo Abril	Mayo Junio	Julio Agosto	Septiembre Octubre	Noviembre Diciembre	Rendimiento medio $\pm$ desviación estándar de cada clon
A2	1,29	0,80	0,81	0,82	1,38	0,58	0,95 $\pm$ 0,31
A3	1,00	0,70	0,45	0,47	1,33	0,50	0,74 $\pm$ 0,35
B1	0,54	0,31	0,70	1,62	1,92	0,82	0,99 $\pm$ 0,63
B2	0,41	0,25	0,72	0,81	1,70	0,92	0,80 $\pm$ 0,50
B3	0,75	0,50	0,55	1,32	3,56	1,08	1,29 $\pm$ 1,15
C1	0,53	0,39	0,40	0,32	1,86	0,95	0,74 $\pm$ 0,59
C2	1,12	0,29	0,34	0,14	1,10	0,62	0,60 $\pm$ 0,42
C3	1,20	0,42	0,41	1,01	2,03	1,51	1,10 $\pm$ 0,63
D1	0,54	0,45	0,69	0,73	1,38	1,34	0,86 $\pm$ 0,40
D2	0,90	0,46	0,46	0,78	1,41	1,11	0,85 $\pm$ 0,37
D3	1,07	0,24	1,26	1,28	1,57	0,84	1,04 $\pm$ 0,46

Tabla 15.- ANOVA encajado para el rendimiento en aceite esencial de las poblaciones y genotipos seleccionados de *S.lavandulifolia*.

Fuente de variación	g.l	MS	F	P
Población	3	0,154	0,603	0,65
Individuo (Población)	7	0,225	0,767	0,61
Error	55	0,337		

El análisis incluye los grados de libertad (g.l), cuadrados medios (MS), estadístico de contraste (F) y probabilidad (P) para cuatro localidades, con tres individuos en cada localidad (excepto en la localidad A que fueron 2 individuos) y tres muestras de cada individuo.

Para confirmar el significativo aumento en la producción de aceite esencial durante los meses de septiembre-octubre y el rendimiento medio en floración (mayo-junio) se volvieron a extraer las esencias durante el año 2011. El rendimiento medio obtenido en este caso fue de 2,16% y de 1,60%, en septiembre-octubre y mayo-junio, respectivamente. Estos valores se corresponden con lo afirmado anteriormente. Además, en ambos casos son valores de rendimientos medios superiores a los registrados en el año 2010.

Tabla 16.- Prueba *post hoc* Tukey HSD para el rendimiento en aceite esencial.

Época de recolección	Rendimiento medio $\pm$ desviación estándar	Grupos equivalentes
Marzo-Abril	0,45 $\pm$ 0,30	A
Mayo-Junio	0,64 $\pm$ 0,17	A
Enero-Febrero	0,88 $\pm$ 0,26	A
Julio-Agosto	0,89 $\pm$ 0,44	A
Noviembre-Diciembre	0,93 $\pm$ 0,66	A
Septiembre-Octubre	1,74 $\pm$ 0,31	B

Las letras indican grupos de tratamiento equivalente



#### IV.2.3.2. Composición química

Además del rendimiento en aceite esencial, en cada caso se analizaron los aceites esenciales mediante GC y GC/MS. Fueron identificados un total de 68 compuestos, representando un rango de identificación de entre el 85,8 y el 99,0% del

total detectado e integrado por cromatografía (ANEXO I, Apartado VII.2.1.). Los porcentajes relativos de los compuestos mayoritarios de cada una de las esencias analizadas, junto con la representación de sus estructuras químicas, se detallan en la tabla 17. Estos compuestos son  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno,  $\beta$ -pineno + mirceno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, *trans*-cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno y viridiflorol.


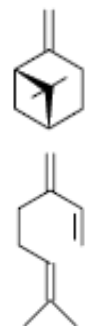
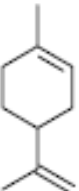
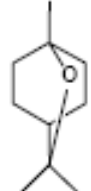
La suma de estos compuestos representa, en todos los casos, un mínimo del 50% del total de compuestos identificados y, en algunos casos, más del 90%. Existen diferencias significativas en los porcentajes relativos de estos compuestos tanto entre los distintos clones como entre las distintas épocas de recolección. Estas diferencias aparecen representadas en la tabla 17 con los resultados de un test de Tukey HSD para diferencias de medias significativas. Iguales letras minúsculas representan los mismos grupos de tratamiento para este test entre las filas de la tabla, es decir, entre los clones para un mismo compuesto. Por otro lado, iguales letras mayúsculas representan los mismos grupos de tratamiento para un test de Tukey HSD entre las columnas de la tabla, es decir, en el porcentaje relativo que se ha obtenido para ese compuesto a lo largo de todo el ciclo anual representado.


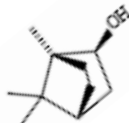
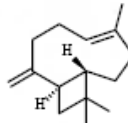
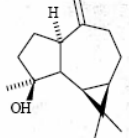
Tabla 17.- Seguimiento anual de los principales constituyentes del aceite esencial de *S. lavandulifolia* durante el año 2010.

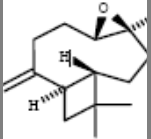
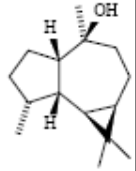
COMPUESTO			Mes de recolección						COMPUESTO			Mes de recolección					
			Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre				Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
$\alpha$ -pineno 	Clon	HSD*	AB	AB	A	B	B	B	canfeno 	Clon	HSD*	A	A	A	A	A	A
	A2	a	10,2	12,1	23,6	8,6	10,7	9,3		A2	ab	2,1	2,4	2,1	2,9	2,4	2,3
	A3	bc	7,8	9,9	19,8	6,8	7,6	1,8		A3	a	4,5	4,0	2,7	4,1	4,0	0,9
	B1	ab	6,0	6,9	11,4	5,0	6,8	7,2		B1	bc	1,5	1,8	1,2	2,1	2,1	2,1
	B2	bc	5,9	4,4	9,6	6,0	6,3	6,4		B2	bc	1,6	1,1	1,6	2,4	1,8	2,1
	B3	bc	3,5	2,4	3,8	2,6	5,5	2,8		B3	cd	0,6	0,9	0,5	0,9	1,7	0,7
	C1	bc	4,2	1,3	12,6	3,8	4,8	4,6		C1	a	3,2	1,0	3,0	4,3	3,9	3,1
	C2	bc	1,9	1,9	2,7	1,1	1,9	5,2		C2	a	3,6	2,4	2,4	2,2	4,4	4,4
	C3	ab	8,7	9,3	9,2	8,2	7,6	9,4		C3	cd	0,6	0,8	0,6	1,2	0,8	1,0
	D1	bc	4,0	3,3	3,4	3,2	3,4	3,2		D1	bcd	0,9	1,2	1,1	2,1	1,4	1,7
	D2	bc	4,4	6,6	10,1	4,7	4,9	5,5		D2	cd	0,8	0,5	1,6	1,5	0,8	0,8
	D3	ab	12,8	14,8	3,5	5,2	8,1	9,9		D3	d	0,2	0,4	0,2	0,6	0,6	0,7

\* Valores seguidos de diferentes letras minúsculas en la columna (filas de genotipos) y de diferentes letras mayúsculas en la fila (columnas de mes de recolección) tienen diferencias significativas mediante el test Tukey HSD ( $p \leq 0,05$ ).



COMPUESTO			Mes de recolección						COMPUESTO			Mes de recolección					
			Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre				Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
Sabineno 	Clon	HSD*	A	B	A	A	A	A	β-pineno + mirceno 	Clon	HSD*	C	AB	A	BC	BC	BC
	A2	f	0,3	0,3	0,5	0,4	0,3	0,6		A2	ab	18,1	18,1	22,4	17,3	18,1	20,0
	A3	f	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2		A3	d	11,8	15,0	11,2	9,6	14,3	6,7
	B1	bc	3,3	2,4	3,2	2,9	3,1	3,0		B1	dcb	10,6	16,8	21,1	11,8	14,0	13,8
	B2	bc	3,4	1,6	3,1	3,0	2,9	2,9		B2	dcb	11,6	12,5	18,5	14,2	14,0	13,7
	B3	ab	4,5	2,2	3,6	3,6	3,2	3,3		B3	dcb	11,9	15,2	25,0	11,7	14,5	12,0
	C1	de	2,0	0,6	1,9	1,9	2,5	2,3		C1	d	9,6	6,4	22,3	9,7	9,8	11,1
	C2	e	1,2	1,3	1,9	0,9	1,2	1,0		C2	dcb	8,8	15,4	22,2	8,6	13,7	13,1
	C3	ab	4,8	2,2	3,1	4,0	3,7	3,7		C3	dc	13,1	12,3	13,6	13,9	12,0	13,1
	D1	a	4,2	3,3	3,7	3,8	3,9	3,8		D1	d	10,5	13,4	13,0	10,6	10,5	10,5
	D2	cd	2,6	1,7	2,9	2,6	2,1	2,2		D2	a	15,0	27,7	21,5	18,7	23,4	23,4
	D3	ab	3,4	1,9	4,1	4,1	3,4	3,6		D3	abc	15,0	22,7	19,0	14,2	16,9	18,1
limoneno 	Clon	HSD*	AB	B	A	AB	AB	AB	1,8-cineol 	Clon	HSD*	A	C	B	B	AB	AB
	A2	cde	4,6	4,8	4,5	5,6	4,0	5,4		A2	de	37,9	24,5	13,3	24,5	25,2	18,3
	A3	a	18,0	17,1	25,1	15,4	19,3	13,2		A3	e	25,5	17,7	18,4	11,6	16,1	5,7
	B1	e	2,2	2,6	2,6	2,7	2,6	2,6		B1	bc	53,1	16,8	38,2	42,7	46,7	43,7
	B2	e	2,4	1,8	2,6	2,6	2,5	2,6		B2	bc	47,9	17,5	41,0	43,2	44,3	42,7
	B3	cde	4,4	5,5	4,8	5,4	4,4	5,7		B3	ab	51,8	27,8	43,3	49,4	48,8	57,0
	C1	cd	6,2	3,9	5,3	7,4	5,9	6,2		C1	de	29,6	13,8	17,3	24,9	38,6	31,6
	C2	b	9,0	7,4	15,2	9,6	10,2	7,8		C2	e	24,2	18,2	11,3	8,2	15,6	15,0
	C3	bc	7,9	7,2	9,1	8,7	6,4	6,9		C3	ab	54,1	31,3	40,6	42,1	56,2	52,1
	D1	de	3,2	4,6	4,8	4,5	4,3	4,5		D1	a	62,7	48,8	52,5	49,1	56,8	54,3
	D2	cde	4,8	3,7	4,7	4,8	5,2	5,2		D2	cd	46,0	22,0	24,3	34,4	37,2	31,2
	D3	de	2,9	3,8	5,4	5,0	5,0	5,3		D3	abc	49,5	10,8	49,2	50,6	47,5	43,0

COMPUESTO			Mes de recolección						COMPUESTO			Mes de recolección					
			Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre				Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
<div>alcanfor</div> 	Clon	HSD*	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>AB</i>	<i>AB</i>	<div>borneol</div> 	Clon	HSD*	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>
	A2	<i>b</i>	11,9	14,8	12,7	21,9	16,8	19,7		A2	<i>b</i>	1,5	2,1	1,6	1,5	1,6	3,4
	A3	<i>cd</i>	7,8	6,0	4,8	17,1	10,3	7,9		A3	<i>a</i>	3,7	3,5	2,3	4,6	4,0	4,8
	B1	<i>def</i>	2,3	3,3	2,7	7,8	5,5	4,3		B1	<i>b</i>	1,6	2,0	1,2	2,6	1,9	1,9
	B2	<i>def</i>	2,4	4,6	4,1	7,2	5,2	5,6		B2	<i>b</i>	1,7	2,8	1,5	2,0	2,0	2,3
	B3	<i>ef</i>	1,2	4,0	1,4	4,7	4,7	2,7		B3	<i>bc</i>	0,4	1,3	0,4	0,7	1,5	0,4
	C1	<i>bc</i>	13,0	13,0	12,2	16,6	13,7	11,1		C1	<i>a</i>	4,7	6,9	4,5	6,3	4,3	4,3
	C2	<i>a</i>	24,4	14,7	19,9	15,1	26,4	28,7		C2	<i>a</i>	4,8	3,5	3,1	4,0	5,3	7,7
	C3	<i>f</i>	0,5	1,1	1,5	2,8	1,4	1,5		C3	<i>bc</i>	0,8	1,6	1,4	2,7	1,5	1,7
	D1	<i>de</i>	2,5	4,7	6,0	11,4	6,8	8,2		D1	<i>bc</i>	0,7	1,1	1,0	2,0	1,3	1,6
	D2	<i>def</i>	2,8	2,7	2,8	7,8	4,8	3,8		D2	<i>bc</i>	0,9	0,8	2,1	2,1	0,7	0,6
	D3	<i>ef</i>	0,7	2,3	0,6	3,3	2,9	2,1		D3	<i>c</i>	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2
<div><i>trans</i>-cariofileno</div> 	Clon	HSD*	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>BC</i>	<i>AB</i>	<i>BC</i>	<i>BC</i>	<div>espatulenol</div> 	Clon	HSD*	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>
	A2	<i>c</i>	0,6	1,5	1,4	1,3	0,9	1,2		A2	<i>b</i>	0,1	1,0	-	-	0,1	0,2
	A3	<i>a</i>	4,8	10,3	7,4	11,9	9,9	24,0		A3	<i>b</i>	-	0,2	-	-	-	-
	B1	<i>c</i>	0,6	4,7	1,6	1,6	1,0	0,9		B1	<i>b</i>	0,1	1,1	-	0,1	-	0,1
	B2	<i>c</i>	0,7	5,9	1,7	1,4	1,2	1,2		B2	<i>b</i>	0,1	1,3	-	-	0,1	0,1
	B3	<i>bc</i>	1,6	11,6	2,9	6,0	2,0	2,7		B3	<i>b</i>	-	0,9	-	-	-	-
	C1	<i>bc</i>	2,0	8,0	3,7	4,0	2,3	2,8		C1	<i>a</i>	3,8	6,7	2,7	2,4	1,6	2,9
	C2	<i>ab</i>	2,8	12,3	5,4	19,9	6,2	2,7		C2	<i>b</i>	0,3	0,2	-	0,1	-	0,2
	C3	<i>c</i>	0,4	3,1	3,1	1,7	0,7	0,7		C3	<i>b</i>	0,3	0,6	0,3	0,4	0,2	0,3
	D1	<i>bc</i>	1,2	7,4	4,2	2,6	2,2	2,5		D1	<i>b</i>	-	0,1	0,1	-	-	-
	D2	<i>abc</i>	2,7	11,8	7,6	7,4	5,2	5,5		D2	<i>b</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
	D3	<i>ac</i>	1,4	12,7	4,1	5,0	3,1	2,6		D3	<i>b</i>	0,1	1,0	-	-	0,1	0,2

COMPUESTO			Mes de recolección						COMPUESTO			Mes de recolección					
			Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre				Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
 óxido de cariofileno	Clon	HSD*	A	A	A	A	A	A	 viridiflorol	Clon	HSD*	B	A	B	B	B	B
	A2	d	0,5	0,4	0,3	0,1	0,2	0,6		A2	b	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,2
	A3	abc	2,3	1,7	0,8	1,6	1,9	9,7		A3	b	0,1	0,1	-		-	0,4
	B1	cd	1,3	2,8	0,6	0,6	0,4	0,9		B1	a	3,9	13,3	3,0	4,9	3,6	4,3
	B2	bcd	1,7	3,1	0,6	0,5	0,8	0,9		B2	a	4,8	13,9	3,7	4,1	4,8	5,3
	B3	abcd	5,3	2,8	1,1	2,2	0,9	2,5		B3	b	0,1	2,9	-	-	2,0	0,1
	C1	abcd	2,5	4,9	1,8	1,4	1,1	1,6		C1	b	0,1	0,1	-	-	-	0,1
	C2	ab	5,4	3,9	2,6	4,1	2,7	2,6		C2	b	0,1	1,7	-	-	0,1	0,1
	C3	cd	0,8	1,3	0,9	0,6	0,5	0,7		C3	b	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1
	D1	abcd	1,4	2,0	1,5	1,3	1,2	1,6		D1	b	-	-	-	-	-	-
	D2	a	5,0	3,5	4,1	2,7	3,0	4,9		D2	b	-	0,1	0,6	-	-	-
	D3	abcd	2,7	4,3	2,3	1,5	1,6	2,5		D3	b	-	-	-	-	-	-

- compuesto no detectado. HSD: Test Tukey HSD. \* Valores seguidos de diferentes letras minúsculas en la columna (filas de genotipos) y de diferentes letras mayúsculas en la fila (columnas de mes de recolección) tienen diferencias significativas mediante el test Tukey HSD ( $p \leq 0,05$ ).

Así, examinando compuesto a compuesto, se pone de manifiesto lo siguiente:

El clon denominado A2 expresa un contenido significativamente más alto de  $\alpha$ -pineno que el resto de los ejemplares. Por otro lado, se podrían agrupar los clones B1, C3 y D3 como de contenido medio de  $\alpha$ -pineno y los restantes como de contenido bajo, en relación al mayor contenido expresado por A2. En cuanto a la época del año, durante los primeros meses va aumentando la proporción de este compuesto en el aceite esencial y es en la época de floración cuando alcanza su máximo en esta especie, para posteriormente decrecer.

Al contrario que en el caso anterior, para el compuesto canfeno no se observan diferencias significativas a lo largo del año. Sin embargo, hay clones cuyas esencias tienen mucha mayor cantidad de este compuesto. Así, los clones C1, C2, A3 y, en menor medida, A2 tienen cantidades relativas de canfeno que pueden considerarse altas si se comparan con las del resto de clones evaluados. En el otro extremo, D3 sólo expresa canfeno en su esencia en forma de proporciones traza.

El compuesto sabineno tampoco presenta grandes oscilaciones en su producción a lo largo del año, aunque durante los meses de marzo-abril (comienzo del desarrollo vegetativo) se observa una proporción menor. Las mayores producciones, en este caso, corresponden al clon D1. Los clones B3, C3 y D3 también pueden considerarse con contenido alto de sabineno en sus esencias. Por el contrario, los dos clones provenientes de la población A sólo expresan sabineno en proporciones traza en cualquier momento de su ciclo biológico.

El conjunto formado con los compuestos  $\beta$ -pineno + mirceno también tiene su máximo de producción durante la época de floración. Se aprecia cómo en los meses anteriores a la floración va aumentando la producción hasta llegar a un máximo en este periodo. Una vez desarrollados los frutos, el contenido de estos dos compuestos va descendiendo durante el otoño e invierno. En este caso, el clon D2 tiene la mayor proporción de estos dos compuestos en sus esencias, correspondiendo las menores a A3, C1 y D1. Aunque hay clones como D1 y D2 que en la naturaleza pertenecen a la misma población y se observan en ellos las mayores diferencias en la producción de  $\beta$ -pineno + mirceno, éstas no son tan amplias como ocurre con otros compuestos. Existe, por tanto, una relativa uniformidad en la producción de estos dos compuestos en relación a las poblaciones de origen.

El caso del limoneno es parecido al anterior. Tiene un máximo de producción en floración aunque, en este caso, se puede deducir que su síntesis se produce de manera

más rápida. En los meses anteriores a la floración se detectaron las menores proporciones y se aprecia una disminución progresiva a lo largo del año una vez alcanzado su máximo durante la floración. En este caso, el limoneno es un compuesto muy característico del clon A3 y, en menor medida, del C2. En el resto es bastante parecido entre sí pero con proporciones bajas si las comparamos con los citados clones.

El caso del 1,8-cineol es especialmente importante ya que es el principal compuesto en la mayoría de los clones estudiados y, además, es el compuesto más citado por la bibliografía para esta especie. Este compuesto presenta las mayores proporciones durante las estaciones de otoño e invierno. La producción no es tan elevada durante la primavera y el verano. Los clones D1, C3 y los tres Bs son los que producen la mayor cantidad de este compuesto. Por otro lado, los clones A2, A3, C1 y C2 expresan las menores proporciones en sus esencias.

El alcanfor es un compuesto en el cual se han observado grandes oscilaciones tanto entre los clones estudiados como a lo largo de la época de recolección. La máxima producción de alcanfor se observó a finales de verano, durante la formación y maduración de los frutos. Estas altas proporciones de alcanfor se mantienen durante todo el otoño y el invierno, descendiendo en primavera. En cuanto a los clones, el C2 expresa significativamente más cantidad de este compuesto que el resto. También se puede considerar alta la cantidad de este compuesto en los aceites esenciales del clon A2. Especialmente interesante es que dos clones provenientes de la misma población, como son C2 y C3, estén en los extremos de la producción de alcanfor. Así, en C3 el alcanfor no llega al 3% de proporción relativa en el aceite esencial en momento alguno a lo largo del año. Por el contrario, en el citado clon C2 la menor proporción encontrada está cercana al 15%.

El compuesto borneol tiene un comportamiento parecido al descrito para el 1,8-cineol en cuanto a las diferencias entre clones. Una vez más, C1, C2 y A3 tienen diferencias significativas con respecto al resto. Pero en este caso, y aún siendo notables las diferentes proporciones, éstas no son tan llamativas como en casos anteriores, manifestándose por tanto una heterogeneidad menor para este compuesto. Además, no se han detectado diferencias en la producción a lo largo del año.

Las oscilaciones más acusadas se presentan en los sesquiterpenos. De los 13 compuestos mayoritarios descritos en este apartado, 4 corresponden a sesquiterpenos y los 9 restantes a monoterpenos. Destacar que en los sesquiterpenos como el espatulenol y el viridiflorol hay épocas del año y genotipos de trabajo en que no se detectan estos

compuestos, a diferencia de los monoterpenos donde los compuestos fueron detectados en todos los casos.

La síntesis de *trans*-cariofileno a lo largo del año no sigue un orden cronológico. Así, describimos las mayores producciones antes de la floración, disminuyendo cuando ésta se produce y aumentando de nuevo durante la formación y maduración de los frutos a finales del verano y principios de otoño, con una nueva disminución durante el invierno. En cuanto a los clones, las mayores diferencias se encuentran entre A3 y C2 con el resto de clones, en especial con A2, B1, B2 y C3. Estos resultados dan lugar a determinar los clones A3 y C2 como altos en relación con el contenido de *trans*-cariofileno.

El óxido de cariofileno es el último de los compuestos descritos que fue detectado en todos los casos. No se puede afirmar que la proporción de este compuesto en los aceites esenciales presente oscilaciones significativas a lo largo del año. Esto es debido a que existe una gran heterogeneidad a la hora de expresar este compuesto entre los distintos clones y ello da lugar a que la agrupación sea menos clara que en casos anteriores. Sin embargo, se puede apreciar fácilmente que el clon D2 es el que mayor proporción presenta en su esencia, siendo por el contrario, A2 el que menor.

Por último, los sesquiterpenos espatulenol y viridiflorol son característicos únicamente de alguno o algunos de los clones estudiados. Así, el espatulenol es característico de C1. En los demás casos en que se detectó, lo hizo en proporciones alrededor del 1% o inferiores. Antes de la floración este compuesto se detectó en todos los clones, siendo también cuando C1 marcó su máximo porcentaje relativo. El viridiflorol es característico de B1 y B2. No se detectó su presencia en los clones D1 y D3, siendo su presencia en el resto únicamente testimonial, cuando se pudo detectar. Al igual que en el caso del espatulenol, todos los clones que expresan este compuesto lo hacen en mayor proporción antes de la época de floración.

Un nuevo análisis multivariante PCA basado en las 66 muestras analizadas de todos clones durante el año 2010 (figura 13), muestra una distribución en el gráfico muy similar a la representada en la figura 11 del **Estudio IV.1**. En la figura 13 se representan los tres primeros componentes, que incorporan una varianza total del 67,13%. El primero de los componentes está mayoritariamente correlacionado de manera positiva con el 1,8-cineol (0,853) y con el sabineno (0,848), mientras que está correlacionado de manera negativa con el borneol (-0,868) y el alcanfor (-0,773). El segundo de los componentes tiene correlación positiva con el  $\alpha$ -pineno (0,781) y

negativa con el óxido de cariofileno (-0,721). Por último, el tercer componente representado presenta la mayor correlación positiva con el *trans*-cariofileno (0,605). Esta representación pone de manifiesto que las muestras analizadas se agrupan conforme al genotipo y no conforme a la época del año en que se han recolectado.

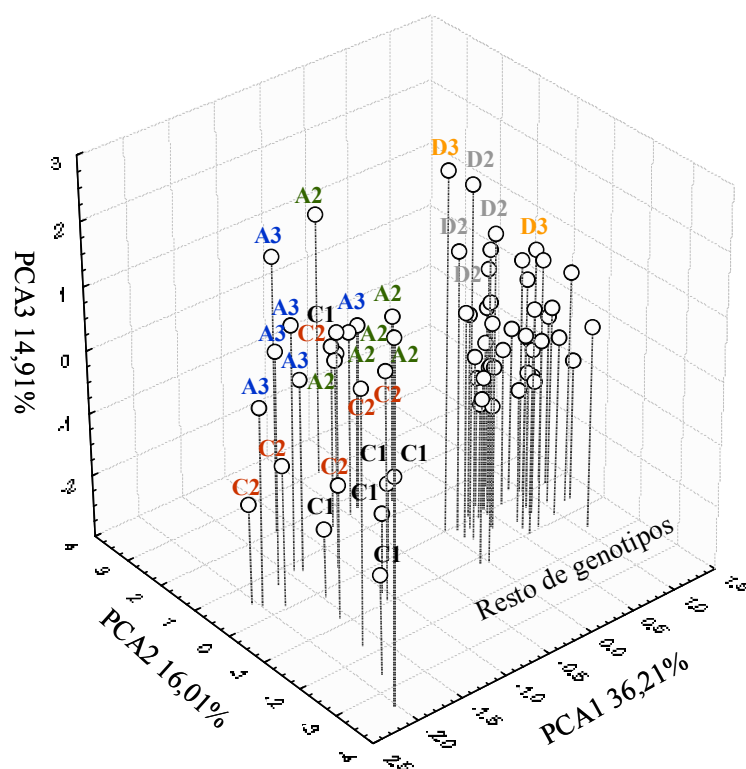
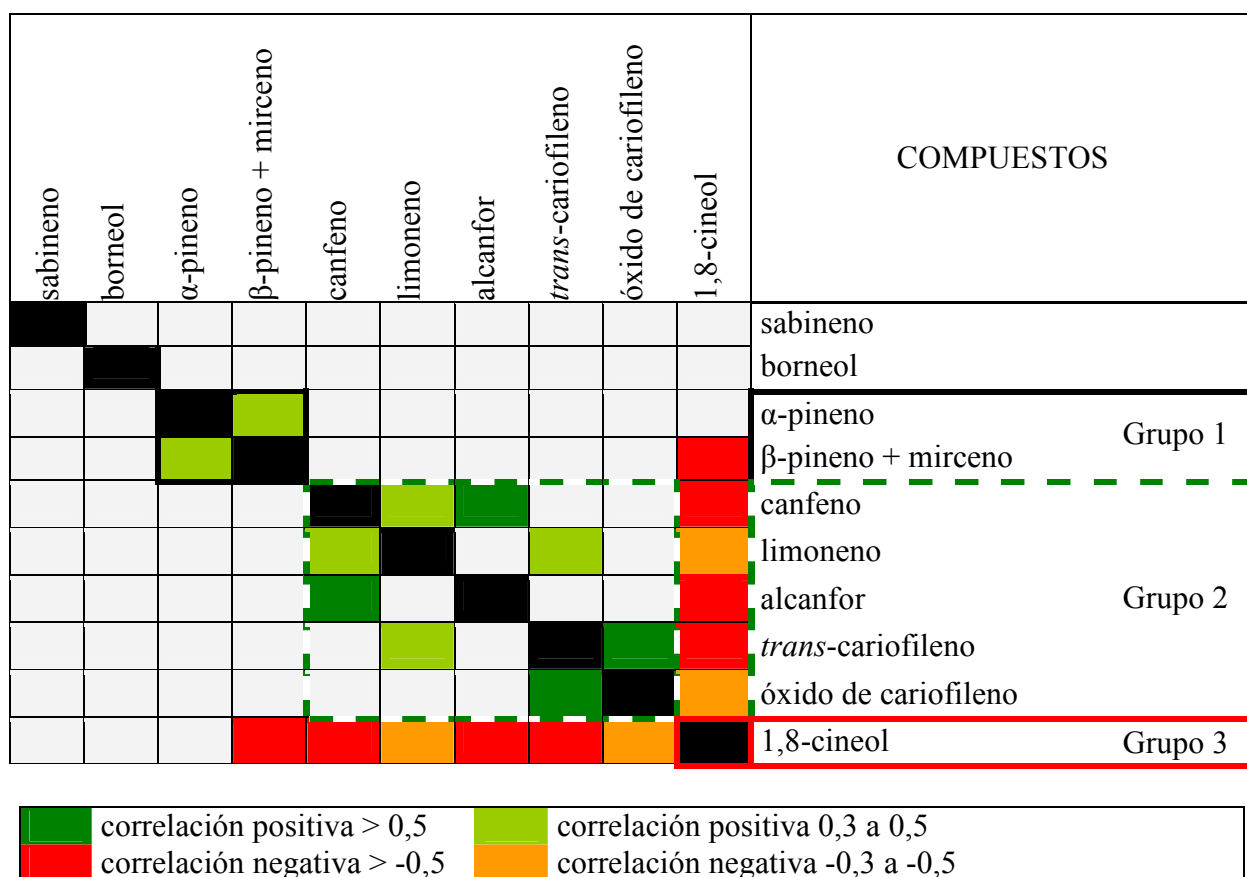


Figura 13.- Posición relativa en el espacio definido por tres componentes principales en base a la composición química de los aceites esenciales de los genotipos de *S. lavandulifolia* evaluados durante el año 2010.

Para una mejor caracterización de la composición química de los aceites esenciales de esta especie, se correlacionaron por pares cada uno de los compuestos que fueron identificados en todas las muestras (figura 14). Con ello se obtiene una caracterización de la evolución temporal de los compuestos mayoritarios. Esto conduce a los patrones de agrupación que aparecen en la citada figura. El cuadro revela que el contenido relativo de los principales compuestos del aceite esencial de *S. lavandulifolia* cambia o evoluciona de manera coordinada a lo largo del ciclo vital de la especie. El primer grupo lo forman los compuestos  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno + mircenol. El segundo grupo está formado por canfeno, limoneno, alcanfor, *trans*-cariofileno y óxido de cariofileno. Por último, un único compuesto formaría el tercer grupo, 1,8-cineol.



En el mapa, los cuadrados de colores representan la significación en una correlación por pares de componentes usando los coeficientes de correlación de Spearman. El valor de esta significación viene dado por los colores. Las correlaciones no significativas después de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples están representadas por los cuadrados color gris.

Figura 14.- Matriz de correlaciones entre los principales compuestos de los aceites esenciales *S.lavandulifolia*.

Sumando los porcentajes relativos de los compuestos que forman cada grupo se establece un patrón temporal en la acumulación de estos compuestos (figura 15). En los meses de baja actividad metabólica, se produce la mayor acumulación de 1,8-cineol (Grupo 3), compuesto mayoritario en el aceite esencial de *S. lavandulifolia*. El porcentaje relativo de este compuesto disminuye de manera muy clara en primavera, cuando la actividad metabólica empieza a ser mayor. A partir de este momento se va acumulando en las glándulas de los tricomas hasta llegar a un máximo a finales del invierno. Los compuestos que forman parte del Grupo 1 tienen un máximo en época de floración. Cuando acaba la floración y comienza la formación y maduración de las semillas, los porcentajes relativos de estos compuestos caen. Finalmente, los



compuestos que forman parte del Grupo 2 tienen un comportamiento oscilante a lo largo del ciclo anual y no parecen seguir un patrón claro.

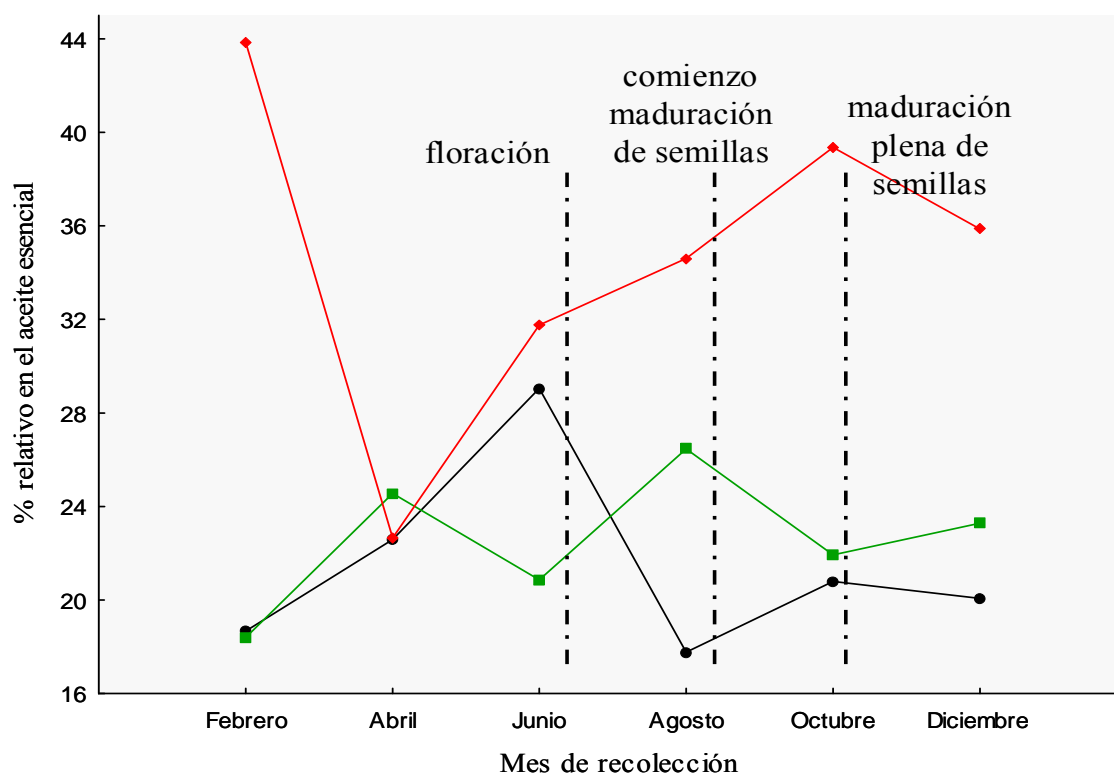


Figura 15.- Evolución anual de los grupos de compuestos. El porcentaje relativo de cada uno de los compuestos que forman los grupos descritos proviene del promedio entre todos los clones evaluados. Cada grupo está formado por la suma de los porcentajes relativos de los compuestos que los forman. El Grupo 1 está representado por el color negro (●), el Grupo 2 por el color verde (■) y el Grupo 3 por el color rojo (◆). La gráfica representa la evolución durante el año 2010.

Aprovechando que el ambiente de crecimiento de todos los clones ha sido el mismo, se utilizó el método propuesto por Soria *et al.* (2008) para la validación estadística de quimiotipos. Estos resultados son especialmente interesantes debido a que se ha controlado el posible efecto ambiental o climático en las diferencias en composición química descritas para los aceites esenciales de los distintos clones de individuos de esta especie con los que se ha trabajado. En primer lugar, se calcula el valor crítico de referencia que posteriormente se compara con el obtenido para los valores experimentales. El valor para 70 muestras (se han analizado 66 a lo largo del

año 2010) de la media (2,784) y desviación típica (0,244) de la distancia de Mahalanobis ( $D_{mah}$ ) para una distribución normal se obtiene de los valores descritos por simulación de distribuciones normales por Soria *et al.* (2008). De acuerdo con la Corrección de Bonferroni por número de compuestos, para un nivel de confianza del 99,99% y 12 compuestos (tabla 18)  $\alpha=0,0001/12= 0,00000833$  y el valor crítico por tanto sería  $2,784 + 0,244 * 3.830 = 3,710$ . La tabla 18 muestra los valores medios, máximos y mínimos encontrados de los 12 compuestos que han sido objeto de estudio.

En la columna de la derecha se señalan con un asterisco los compuestos con  $D_{mah}$  superior a 3,710. Además, se exponen la media y el número de muestras que componen cada uno de los grupos que se disciernen bajo el criterio de agrupación de las k-medias. Conforme a las  $D_{mah}$  calculadas para cada compuesto se observa que la existencia de agrupaciones es significativa para los compuestos canfeno, limoneno, 1,8-cineol, *trans*-cariofileno y espatulenol. Estos compuestos pueden utilizarse para discernir entre quimiotipos.

Tabla 18.- Compuestos evaluados para 66 muestras recolectadas durante el año 2010 provenientes de 11 clones cultivados de *S. lavandulifolia*.

Compuestos	V.medio	V.mínimo	V.máx.	Media G1	NG1	Media G2	NG2	$D_{mah}$
$\alpha$ -pineno	6,6	1,1	23,6	4,4	45	11,3	21	2,63
canfeno	1,83	0,2	4,5	2,97	28	0,99	38	4,19*
sabineno	2,36	0,1	4,8	3,25	41	0,90	25	3,51
$\beta$ -pineno + mirceno	14,82	6,7	27,7	12,15	45	20,58	21	1,38
limoneno	6,34	2,2	25,2	17,61	7	5,01	59	5,63*
1,8-cineol	34,7	5,7	62,7	19,74	30	47,13	36	4,05*
alcanfor	7,8	0,6	28,7	16,44	21	3,86	45	3,56
borneol	2,24	0,1	7,7	4,63	18	1,34	48	3,69
<i>trans</i> -cariofileno	4,47	0,6	24	11,58	14	2,56	52	3,82*
espatulenol	0,46	0	6,7	3,70	5	0,19	61	6,50*
óxido de cariofileno	2,05	0,1	9,7	1,46	55	5,00	11	3,47
viridiflorol	1,2	0	13,9	14,22	11	0,24	55	3,65

Valores mínimos, medios y máximos de sus concentraciones relativas. Grupos (media y número de muestras) obtenidos mediante el procedimiento de las k-medias, distancia de Mahalanobis  $D_{mah}$  entre grupos y significación estadística de los grupos hallados. \* valor mayor que el valor crítico para el nivel de significación  $\alpha= 0,0001$ .

En el caso para el que la  $D_{mah}$  tiene el valor más alto (espatulenol), se forma un grupo compuesto por tan sólo 5 muestras que corresponden al clon C1. De igual modo, para el limoneno se forma un grupo constituido por 7 muestras, 6 de las cuales corresponden al clon A3. También se pueden distinguir los clones A3 y C2 para el *trans*-cariofileno en las 14 muestras que forman el grupo con la media más alta para este compuesto. Para 1,8-cineol y canfeno la agrupación conforme a los clones de trabajo no aparece de forma tan clara. Esto puede dar idea de que el estado fenológico y/o la época del año en que se recogieron las muestras tiene más influencia en la síntesis de estos dos compuestos de lo que se puede inferir que tiene en los otros. Por lo tanto, los compuestos canfeno, limoneno, 1,8-cineol, *trans*-cariofileno y espatulenol, que no provienen de distribuciones normales, a la luz de nuestros resultados son válidos para la búsqueda y descripción de quimiotipos en *S. lavandulifolia*.

Las figuras 16 y 17 representan un análisis de conglomerados (CA) utilizando distancias euclídeas con el método de Ward y un análisis PCA de los aceites esenciales extraídos de los clones de trabajo en Octubre de 2011, respectivamente. Tras más de 3 años desde la reproducción vegetativa en invernadero e instalados en un mismo ambiente para todos ellos, se distingue un patrón muy similar al original, derivado de la recolección de material vegetal silvestre. Tanto el análisis de conglomerados como el análisis PCA obtenidos revelan las mismas agrupaciones de los individuos que las representadas en las figuras 11 y 12. Se representa en la figura 17 una varianza del 77,24% formada por los tres primeros componentes. El componente F1 está, al igual que en la figura 10, positivamente correlacionado con el contenido en 1,8-cineol (0.991) y negativamente con *trans*-cariofileno (-0,791), además de con el alcanfor (-0.893). El componente F2 está negativamente correlacionado con el nivel de  $\alpha$ -pineno (-0,910) y  $\beta$  pineno + mirceno (-0.895).

Estos resultados confirman las diferencias en la composición química de los aceites esenciales previamente descritas en las poblaciones naturales. No ha habido convergencia en cuanto a la composición química de los aceites esenciales. Los clones A2, A3, C2 y C1 han seguido manteniendo las mayores diferencias entre sí y de éstos con los restantes clones. Las mismas características descriptivas de las esencias encontradas en las poblaciones naturales se ponen de manifiesto en cultivo.

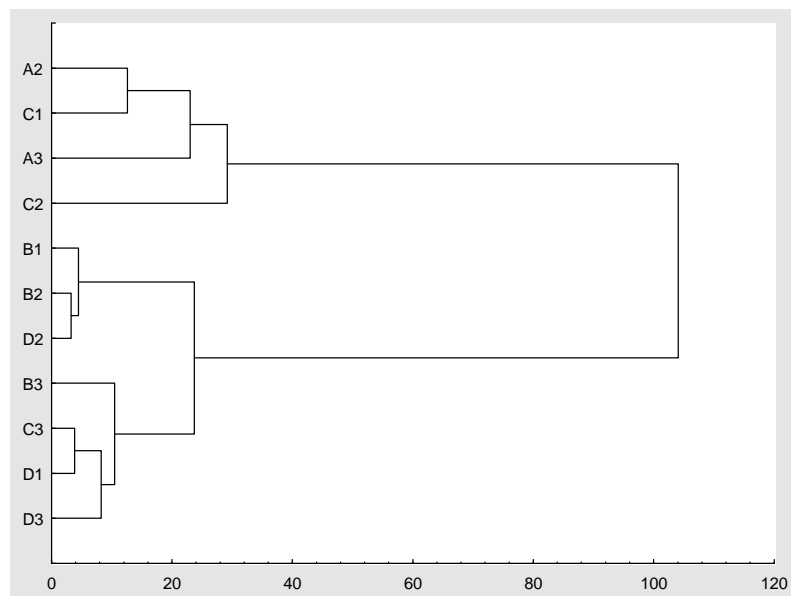


Figura 16.- Análisis cluster de acuerdo con la composición química de once genotipos seleccionados de *S. lavandulifolia* utilizando el método de Ward basado en distancias euclídeas entre genotipos. Material vegetal recolectado en Octubre de 2011 en el C.I.A de Albaladejito.

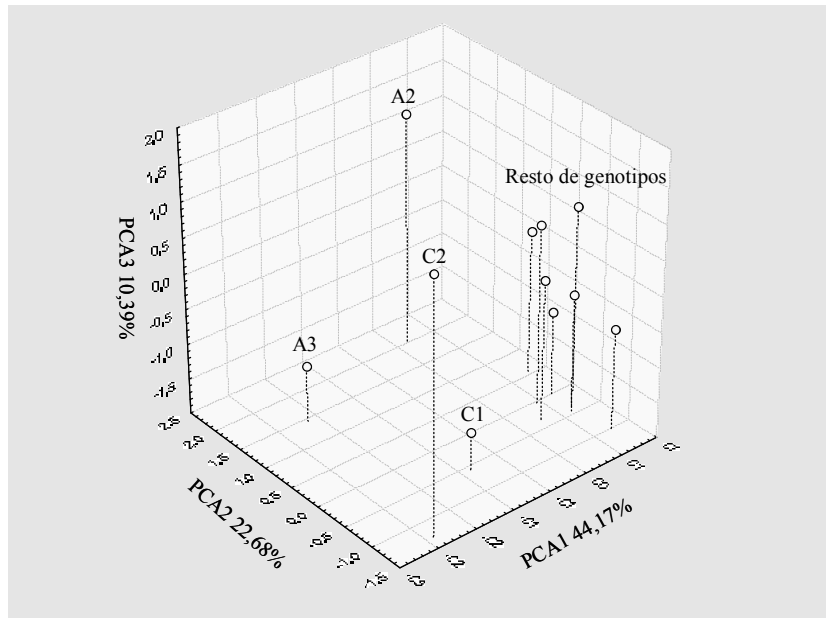


Figura 17.- Posición relativa en el espacio definido por tres componentes principales en base a la composición química de los aceites esenciales de los clones de *S. lavandulifolia* extraídos de material vegetal recolectado en Octubre de 2011 en el C.I.A de Albaladejito.

#### IV.2.3.3. Influencia del estrés hídrico

Desde mediados del mes de junio hasta el mes de octubre de 2011 se produjo una falta casi total de precipitaciones que trajo consigo valores extremadamente bajos en la humedad del suelo de la parcela de experimentación. Los registros climatológicos se pueden consultar en el ANEXO III. Como se mencionó en el Apartado IV.2.3.1., los rendimientos medios en aceite esencial obtenidos durante el año 2011 fueron de 1,60% para el mes de junio y de 2,16% para el mes de octubre. En ambos casos, el rendimiento medio es mayor que el registrado en el año 2010 (figura 18).

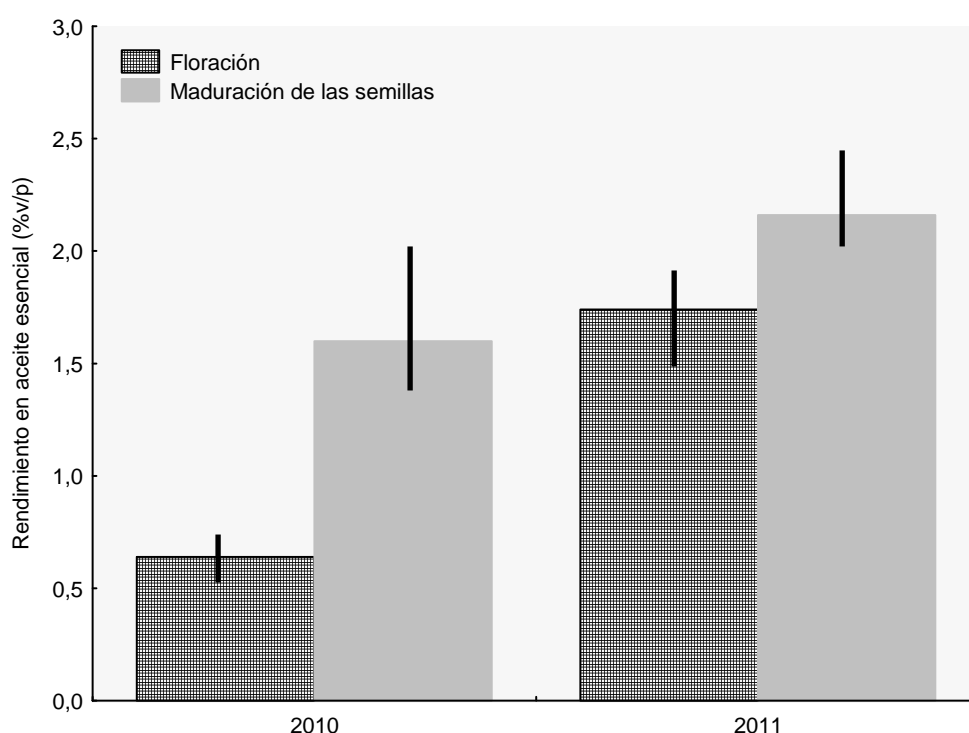


Figura 18.- Rendimientos medios en aceite esencial ( $\pm$  desviación estándar) de todos los genotipos de trabajo durante los años 2010 y 2011 en los periodos de floración y maduración de las semillas.

Los valores de la humedad de las parcelas se presentan en este apartado en forma de diagramas (figura 19).

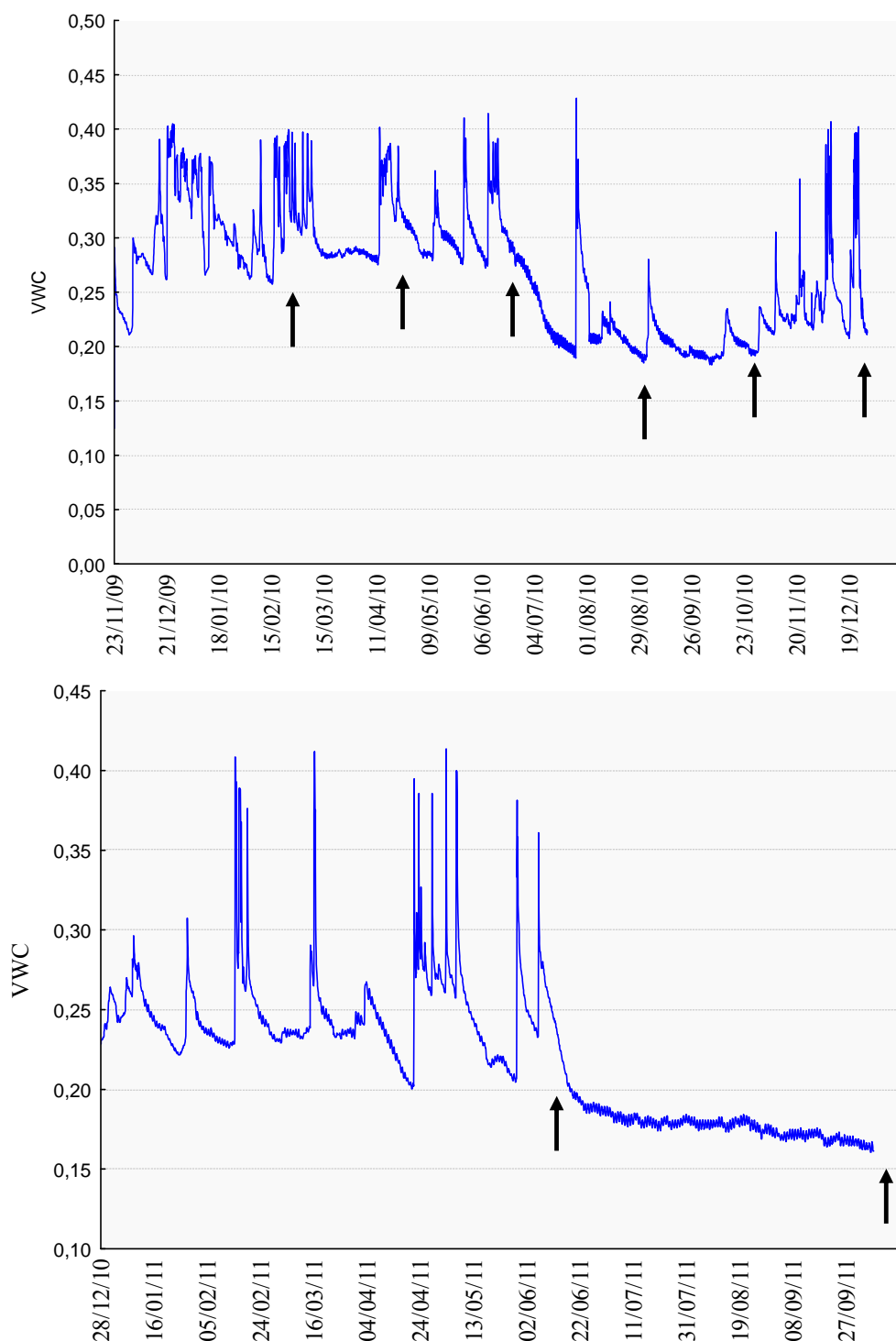


Figura 19.- Monitorización de la humedad del suelo en la parcela de cultivo de *S. lavandulifolia* en el C.I.A de Albaladejito durante los años 2010 y 2011, respectivamente. El año 2011 está representado de enero hasta octubre. Los datos representados son las medias obtenidas por tres sondas dispuestas a 10, 30 y 40 cm de la superficie del suelo. Las flechas indican los momentos de recolección de material vegetal.

Esta figura muestra un descenso acusado y continuado de la humedad del suelo desde principios de junio y hasta finales de septiembre de 2011. Además, los episodios de lluvias durante la primera mitad del año 2011 fueron igualmente menores que en el mismo periodo de 2010 (ANEXO III). En el momento de la recolección de material vegetal en floración en el año 2010 los niveles de humedad del suelo eran de alrededor de 0,28 VWC, mientras que en el mismo periodo del año 2011 estos niveles bajaron hasta los 0,20 VWC. De igual modo, en el momento de plena maduración de las semillas los niveles de humedad del suelo se situaron en niveles cercanos a los 0,15 VWC en el año 2011. Entre estos periodos, en el año 2010, floración y maduración de las semillas, se aprecian diversos episodios de precipitaciones, los cuales fueron totalmente ausentes en el año 2011 (figura 19 y ANEXO III). Esto ocasionó un descenso continuado de los valores de humedad del suelo. Además, como se puede apreciar en la figura 20, los valores medios de temperatura en todos los meses que comprenden desde el comienzo de la floración hasta la maduración total de los frutos, fueron mayores durante la campaña 2011.

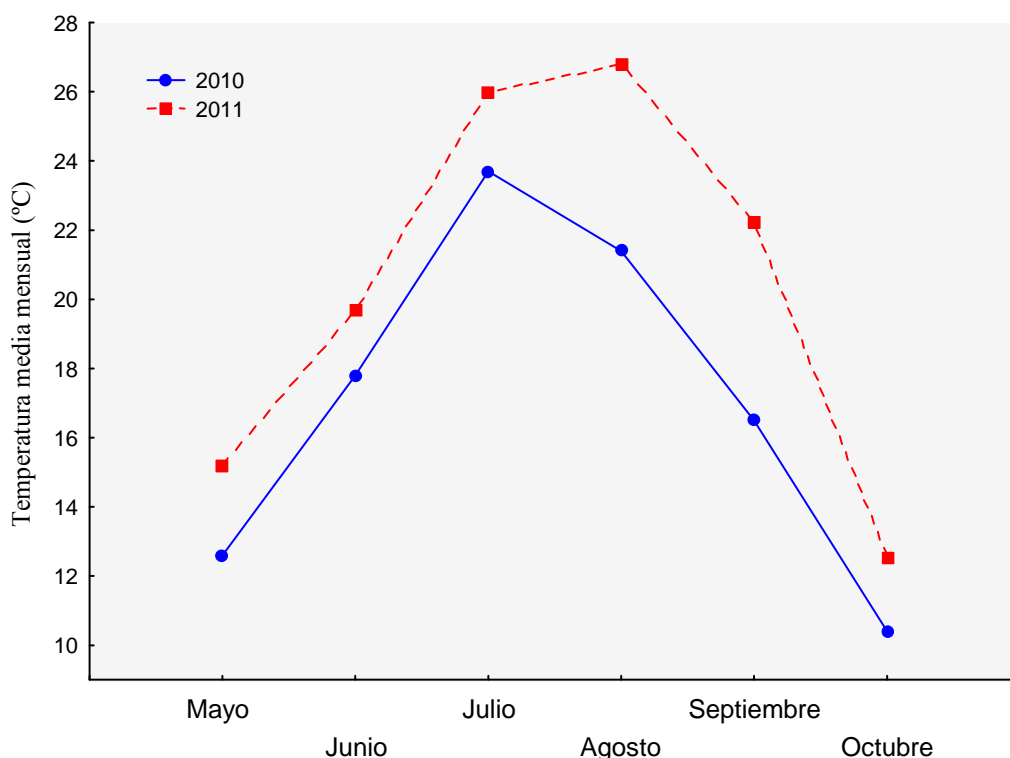


Figura 20.- Temperaturas medias mensuales durante los años 2010 y 2011 en la parcela de cultivo de *S. lavandulifolia*. Los meses representados son los comprendidos entre el comienzo de la floración y la maduración completa de las semillas.

Este hecho contribuyó a aumentar la situación de estrés hídrico para los genotipos de trabajo durante el citado año.

Para finalizar, la tabla 19 muestra cómo únicamente los compuestos  $\beta$ -pineno + mirceno y sabineno tienen diferencias significativas en sus porcentajes relativos en el aceite esencial conforme a los años de estudio. En este caso, el contenido en  $\beta$ -pineno + mirceno disminuyó cuando las plantas estaban en una evidente situación de estrés hídrico. El sabineno experimenta un considerable aumento bajo un estrés hídrico moderado. El resto de compuestos que forman parte de los aceites esenciales no se vieron afectados significativamente conforme a sus porcentajes relativos. Sin embargo, agrupando los compuestos conforme a su estructura química se encuentran diferencias significativas entre los años 2010 y 2011. Así, la comparación de medias con análisis ANOVA entre estos dos años en compuestos agrupados como monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados, obtiene valores significativos en el estado de plena maduración de las semillas, excepto para los sesquiterpenos oxigenados. El estrés hídrico únicamente tiene ligeros efectos sobre la composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* aumentando la proporción de monoterpenos oxigenados y disminuyendo, en consecuencia, las de monoterpenos y sesquiterpenos hidrocarbonados. No obstante, como se ha descrito anteriormente, éste trae como consecuencia una mayor producción de esencia.



Tabla 19.- Comparación de los principales constituyentes del aceite esencial de *S. lavandulifolia* durante los años 2010 y 2011.

Compuesto	Recolección	AÑO		ANOVA p-valor
		2010	2011	
$\alpha$ -pineno	Junio	8,6	9,6	0,79
	Octubre	6,1	6,0	0,93
canfeno	Junio	1,3	1,4	0,76
	Octubre	1,8	1,5	0,62
sabineno	Junio	1,1	2,5	<0,01
	Octubre	2,6	2,9	0,7
$\beta$ -pineno + mirceno	Junio	19,6	16,0	0,06
	Octubre	15,2	11,3	0,02
limoneno	Junio	6,0	5,0	0,52
	Octubre	5,0	3,7	0,22
1,8-cineol	Junio	34,9	30,9	0,55
	Octubre	42,0	54,2	0,08
alcanfor	Junio	5,7	4,7	0,69
	Octubre	8,3	6,1	0,58
borneol	Junio	1,4	1,0	0,37
	Octubre	1,8	1,6	0,59
<i>trans</i> -cariofileno	Junio	3,6	5,0	0,16
	Octubre	2,5	1,0	0,05
óxido de cariofileno	Junio	1,5	1,4	0,83
	Octubre	1,3	1,4	0,75
Monoterpenos hidrocarbonados	Junio	42,2	35,4	0,33
	Octubre	33,2	25,0	<0,01
Monoterpenos oxigenados	Junio	45,8	42,6	0,23
	Octubre	56,0	66,3	<0,05
Sesquiterpenos hidrocarbonados	Junio	6,9	8,4	0,17
	Octubre	5,8	2,1	<0,01
Sesquiterpenos oxigenados	Junio	2,5	3,8	0,24
	Octubre	2,7	2,1	0,24

Los datos representan los valores medios de los porcentajes relativos de cada uno de los compuestos para los genotipos de trabajo.

#### IV.2.4. Discusión

Las diferencias en la composición química de dos aceites esenciales que provengan de una misma especie es, en muchos casos, difícil de explicar o asignar a quimiotipos concretos o a diferencias como consecuencia de una respuesta ante unas condiciones ambientales determinadas. Además, las condiciones de manejo y de extracción de las muestras, junto con el estado fenológico en que se encuentra el vegetal en el momento de la recolección, pueden dar lugar a resultados variables. Establecer una correlación entre los ecotipos y posibles quimiotipos encontrados en las poblaciones naturales y los factores ambientales que los condicionan, junto con la determinación de la impronta genética en la expresión de los aceites esenciales, puede ayudar a conseguir aceites esenciales con mayor trazabilidad y seguridad tanto en el suministro como en la calidad obtenida, además de determinar los periodos óptimos de cosecha.

##### IV.2.4.1. Rendimiento en aceite esencial

Los rendimientos en aceite esencial obtenidos a lo largo de todo el año 2010 para los clones cultivados demuestran una amplia variabilidad. Se observan diferentes rendimientos tanto entre los clones de trabajo para una misma época del año, como entre los distintos momentos de recolección (tabla 14). Aunque existen diferencias entre los clones, éstas no son significativas. Comparando los resultados obtenidos cuando las plantas se han desarrollado en el mismo ambiente, con los obtenidos en las poblaciones naturales (figura 8, tabla 6), se aprecia que ha existido convergencia en cuanto al rendimiento en aceite esencial. En las poblaciones naturales las diferencias se hacen significativas a nivel de población, es decir, a un nivel ambiental o edafo-climático distinto entre las plantas que pertenecen a poblaciones separadas. Sin embargo, en este caso y bajo un mismo ambiente de crecimiento, ya no existen diferencias significativas entre los datos de rendimiento conforme a los clones respecto a su población de origen (tabla 15). Este hecho indica que, mayoritariamente, en *Salvia lavandulifolia* la producción y almacenamiento en los tricomas glandulares del aceite esencial viene determinado tanto por las condiciones ambientales como por el estado de desarrollo y fenológico de las plantas.

Una época de recolección destaca conforme al rendimiento. Durante los meses de septiembre y octubre la producción de aceite esencial se incrementa notablemente. Este momento coincide, bajo nuestras condiciones de trabajo, con la época de completa maduración de las semillas. En el otro extremo, durante los meses de marzo-abril, cuando empieza a aumentar la actividad metabólica de las plantas, es cuando menor rendimiento medio se obtiene. Además, los resultados obtenidos durante el año 2011 confirman el hecho de que con la maduración de las semillas es cuando se obtienen los mayores rendimientos. Si bien existen referencias en la literatura sobre el rendimiento en aceite esencial de *S. lavandulifolia* (Guillén *et al.*, 1996; Leung & Foster, 1996, Guillén & Manzanos, 1999; Burillo, 2003) y de otras muchas especies, normalmente, estos datos hacen referencia a un estadio fenológico (la floración en la mayoría de los casos) o, a una muestra concreta. Son pocos los casos en los que se realiza un seguimiento y monitorización del rendimiento a lo largo del ciclo fenológico y, sin duda, es la primera vez que se hace para esta especie. Por otro lado, todos los rendimientos encontrados se hallan dentro de los rangos descritos en la bibliografía.

En muchas especies de interés comercial, los rendimientos en aceite esencial sufren cambios a lo largo del año. Este hecho, junto con el que relaciona la composición química, puede llegar a ser un factor fundamental desde el punto de vista agronómico y económico, ya que ayuda a determinar los momentos adecuados para las cosechas (Figueiredo *et al.*, 2008). Estos cambios en la biosíntesis de aceite esencial pueden ser atribuidos a factores como el nivel de las precipitaciones, la intensidad de la radiación solar o la temperatura (Barra, 2009). Nuestros resultados muestran que estos factores sólo condicionan en parte los rendimientos en aceite esencial. Con un aumento de temperaturas medias y un descenso en el nivel de precipitaciones aumenta la biosíntesis de esencia en *S. lavandulifolia*. Sin embargo, bajo cualquier circunstancia y en todos los genotipos evaluados, los rendimientos son significativamente mayores en estado de completa maduración de las semillas (otoño) (tabla 16, figura 21).

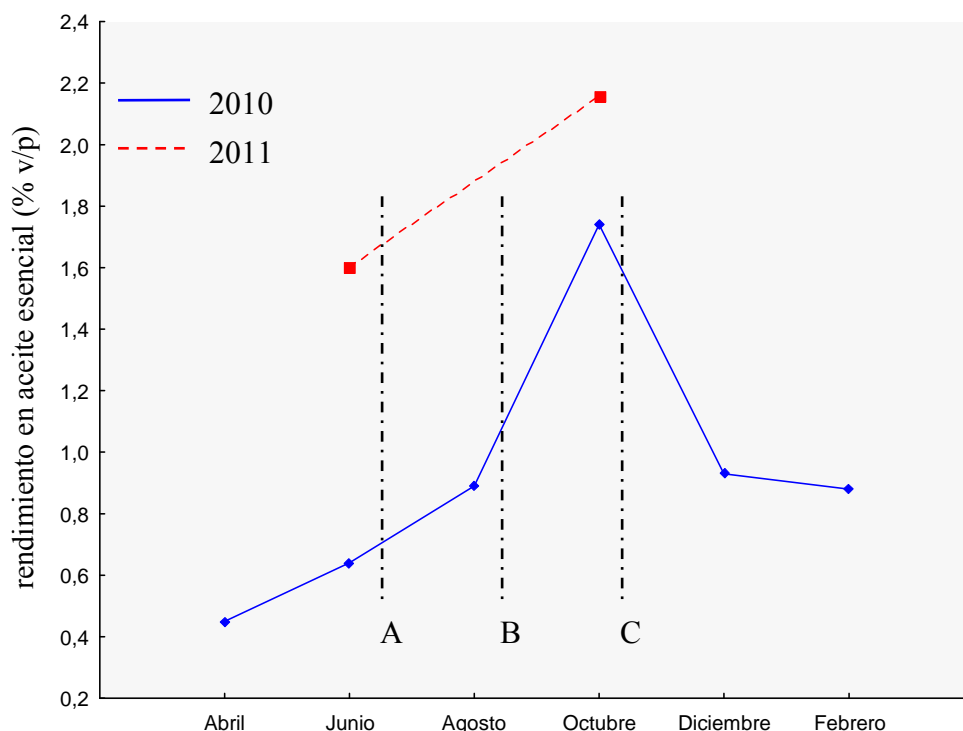


Figura 21.- Fluctuación en los valores de rendimiento en aceite esencial en *S. lavandulifolia*. Las letras representan estadios fenológicos: A (comienzo de la floración), B (comienzo de maduración de las semillas) y C (completa maduración de las semillas).

Diversidad de estudios en la bibliografía describen fluctuaciones en los rendimientos en aceites esenciales en relación al estado fenológico de las especies o las estaciones del año (Chericoni *et al.*, 2004; Angioni *et al.*, 2006; Van Vuuren *et al.*, 2007). En estos estudios, se pueden encontrar fácilmente resultados dispares e incluso, en ocasiones, contrapuestos. Así, McGimpsey *et al.* (1994) describen los mayores rendimientos durante la floración en *Thymus vulgaris*. Por otro lado, Da-Silva *et al.* (2003) y Hussain *et al.* (2008) en *Ocimum basilicum* y, Trivino & Johnson (2000) en *Origanum majorana*, certifican los mayores porcentajes de aceite esencial durante la época de invierno. En el caso de *Salvia officinalis*, es posible encontrar en la bibliografía rendimientos máximos en floración (Pitarevic *et al.*, 1984) o durante la época vegetativa de la planta (Perry *et al.*, 1999). En este sentido, especies de salvias de Sudáfrica (*Salvia africana-caerulea*, *Salvia africana-lutea* y *Salvia lanceolata*) también muestran mayores rendimientos durante la floración, y ésta se indica como la tendencia principal en las especies de plantas aromáticas de la familia *Lamiaceae* (Hay, 1993). Diversos compuestos volátiles que forman parte del aceite esencial, derivados

isoprenoides, tienen actividad antibacteriana, anti-herbivoría, atrayente de polinizadores, o funciones alelopáticas en relación a la inhibición de la germinación de ciertas semillas (Dudareva *et al.*, 2004; Owen & Peñuelas, 2005). La acumulación de aceite esencial durante la época de otoño en *S. lavandulifolia* podría tener un papel importante a la hora de protección de la planta y sus semillas frente a bacterias y hongos fitopatógenos. Además, el aporte al suelo de hojas durante las épocas de otoño e invierno podría favorecer la incorporación al suelo de estos compuestos. Con la acumulación en el sustrato de terpenoides se podría impedir la nascencia de plantas vecinas e impedir nueva competencia por los recursos al comienzo de la primavera.

Mientras que el aroma de las flores parece estar ontogenéticamente programado, la cantidad y composición química de los compuestos orgánicos volátiles que se liberan por parte de una planta en determinado momento pueden variar de manera notable en situaciones de estrés (Heil, 2008). Esta situación de estrés puede estar causada por un daño en los tejidos de la planta por otro organismo (herbivoría, parasitismo, etc.) o por factores abióticos como la luz, la temperatura o la humedad. Bajo condiciones de estrés hídrico, la fotosíntesis está limitada debido a la baja disponibilidad de CO<sub>2</sub> por el cierre estomático y a la reducción de la conductancia del mesófilo (Azcón-Bieto & Talón, 1993).

Normalmente, los distintos años representan diferentes condiciones agronómicas. Cuando se cultiva en lugares geográficos con clima mediterráneo continentalizado como es nuestro caso, los cultivos están sometidos a situaciones de estrés hídrico más o menos intenso, especialmente en verano, debido a la escasez de precipitaciones. Tal y como se expone en este trabajo, esto ocasiona cambios en la biosíntesis de aceite esencial en *S. lavandulifolia*. Estos cambios son resultado de interrupciones en la función fotosintética, en la transpiración y en otros procesos metabólicos (Sarker *et al.*, 2005). Durante el año 2011, los rendimientos fueron mayores en todos los casos, obteniendo rendimientos medios de 1,6% en época de floración y de 2,16% en época de maduración de las semillas. Este hecho indica que las condiciones climáticas de ese año han favorecido, de un modo u otro, la producción de aceite esencial en esta especie. El año 2011 se ha caracterizado por una notable falta de precipitaciones. De manera concreta, hubo una escasez de lluvias casi total durante los meses de julio, agosto y septiembre (ANEXO III), lo que dio lugar a una caída en los datos de humedad del suelo (figura 19). De igual modo, las precipitaciones acumuladas desde marzo hasta junio en este año fueron sustancialmente menores (193 mm) que las

acumuladas durante el año 2010 (278 mm). Además, en el año 2011 las temperaturas medias mensuales fueron mayores durante todo este periodo (figura 20). Bajo estas condiciones, los rendimientos en floración (junio) y durante la maduración de las semillas (octubre) fueron muy superiores. Los mayores rendimientos siguen produciéndose cuando las plantas se encuentran en plena maduración de las semillas, pero cuando la climatología trae consigo escasez de precipitaciones, se consiguen rendimientos medios que sobrepasan el 2%. Por otro lado, con un estrés hídrico más moderado y en época de floración, cuando la falta de precipitaciones en relación al año anterior no era todavía demasiado acusada, los rendimientos obtenidos prácticamente se han multiplicado por tres, llegando hasta rendimientos medios de 1,6%. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Zhetab-Salmasi *et al.* (2001) para cultivos de anís (*Pimpinella anisum* L.). Otros trabajos muestran cómo los rendimientos de los cultivos de *Rosmarinus officinalis* L. disminuyen bajo condiciones de estrés hídrico (Singh & Ramesh, 2000). Estos rendimientos son menores al estar calculados en base a producciones de aceite esencial por hectárea de cultivo. Claramente, al disminuir la biomasa vegetal por efecto del estrés hídrico, los rendimientos relativos a la superficie son menores. Pero en nuestro caso, al relacionar el rendimiento al peso seco de material vegetal destilado como mililitros de esencia extraída por cada 100 gramos de material vegetal seco destilado (%), los resultados son opuestos. Aunque el principal efecto del estrés hídrico es la reducción de la biomasa vegetal en los cultivos, este hecho se ve compensado por un aumento en los rendimientos por peso de planta destilada (Petropoulos *et al.*, 2008). La reducción en la biomasa podría compensarse aumentando las densidades de plantación, aunque este hecho debe ser contrastado en sus efectos, debido al aumento de competencia por los recursos.

Situaciones de estrés hídrico parecen tener resultados contrapuestos dependiendo de la especie con la que se trabaje y el diseño experimental. Así, estas situaciones parecen haber favorecido la producción de esencia en otras especies como *Pinus sylvestris*, *Picea abies*, *Ocimum basilicum* o *Artemisia dracunculus* (Turtola *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2008). Estudios con diversas dosis de riego en orégano (*Origanum vulgare*) muestran que situaciones de estrés hídrico moderado aceleran la producción de aceite esencial, mientras que el estrés hídrico severo hace decrecer su biosíntesis (Said-Al Ahl *et al.*, 2009). Sin embargo, una restricción en el aporte de agua al cultivo después del comienzo de la floración incrementa la cantidad y calidad del aceite esencial extraído (Azizi *et al.*, 2009). Por otro lado, se han observado los

mayores rendimientos en aceite esencial en situación hídrica de capacidad de campo en *Mentha piperita*, disminuyendo el rendimiento al mismo tiempo que lo hacen los niveles de irrigación (Khorasaninejad *et al.*, 2011). Otro estudio con cardo mariano (*Silybum marianum*) (Malekzadeh *et al.*, 2011) muestra resultados similares. Un estrés hídrico medio aumenta la producción de aceite esencial en diferentes especies (Singh *et al.*, 1997; Fatima *et al.*, 2000; Said-Al Ahl *et al.*, 2009), mientras que un estrés hídrico severo hace decrecer la biosíntesis de aceite esencial. Las plantas, en esta situación de estrés debido a las condiciones ambientales o a la falta de nutrientes, son más susceptibles a enfermedades. Limitaciones en la disponibilidad de agua pueden restringir la biosíntesis de compuestos orgánicos volátiles mientras que situaciones severas de estrés reducen drásticamente sus emisiones a la atmósfera (Owen & Peñuelas, 2005). En *S. lavandulifolia*, tanto la situación de estrés hídrico moderado como la de estrés hídrico severo, han favorecido los rendimientos. Este hecho ha podido ser debido, más que a un aumento en su síntesis, a una disminución en la emisión de compuestos volátiles que ocasiona una mayor acumulación de esencia en los tricomas glandulares.

#### IV.2.4.2. Composición química

Los análisis cromatográficos revelan que los compuestos volátiles más importantes en el aceite esencial de *S. lavandulifolia* son  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno + mircenol, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, *trans*-cariofileno, espatulenol, óxido de cariofileno, y viridiflorol. No todos estos compuestos son igualmente representativos de las esencias de los diferentes clones evaluados. Se han constatado grandes diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición química de los aceites esenciales entre las distintas épocas de recolección de material vegetal y entre los diferentes genotipos. Descartada la hipótesis de la influencia de diferentes factores ambientales, la variabilidad química observada refleja diferencias genéticas entre los distintos pies individuales procedentes de poblaciones naturales, multiplicados éstos vegetativamente y cultivados bajo unas mismas condiciones. Desglosando esa variabilidad en los citados compuestos mayoritarios del aceite esencial, se puede apreciar la identidad química de los distintos clones de trabajo y la evolución que presentan estos compuestos a lo largo del ciclo fenológico de la especie (tabla 17).

Entre los monoterpenos, los compuestos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno + mircenos y limoneno experimentan sus máximas proporciones en el aceite esencial durante la floración. En el caso de los compuestos  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno + mircenos los niveles van aumentando a comienzos de año hasta llegar a un máximo en floración. Sin embargo, para el caso de limoneno, su máximo en época de floración viene precedido del mínimo rango de porcentaje relativo encontrado en el estadio anterior. En los tres casos, una vez pasado el periodo de floración, los niveles de estos compuestos comienzan a disminuir. Esto indica que estos compuestos pueden jugar un papel relevante en los procesos de floración y/o polinización en esta especie. A este respecto, se han observado grandes aumentos del compuesto  $\beta$ -pineno en época de floración en *S. officinalis* (Perry *et al.*, 1999). En este sentido, los compuestos  $\beta$ -pineno y limoneno se describen como mayoritarios en las flores de *S. officinalis* (Santos-Gomes & Ferreira, 2001), sin embargo, dejan de serlo cuando se destila toda la parte aérea de la planta. Por otro lado, estos compuestos presentan sus mayores porcentajes relativos durante la época vegetativa en otras especies de *Lamiaceae* como *Thymus vulgaris* y *Thymus hyemalis* (Jordán *et al.*, 2006).

Sin embargo, varios aspectos hacen desestimar esta afirmación. En primer lugar, cuando se extraen por separado los aceites esenciales de las flores, estos compuestos no contribuyen de manera destacable en la esencia. Tanto es así, que el compuesto  $\alpha$ -pineno no fue detectado en muestra alguna y los compuestos  $\beta$ -pineno + mircenos y limoneno representaron de media un 4 % y un 3,3%, respectivamente (**Estudio IV.3.**, tabla 22). Otro aspecto es que, aunque la tendencia general es encontrar máximos de estos compuestos en época de floración, destilando toda la parte aérea de la planta, en ciertos genotipos no se da esta circunstancia. Además, existen grandes diferencias entre los clones de trabajo en cuanto a la expresión de estos compuestos.

Los compuestos canfeno y borneol no describen oscilaciones significativas a lo largo del ciclo fenológico de la especie. Sin embargo, sí muestra una oscilación notable el 1,8-cineol (figura 15). Por otro lado, estos tres compuestos presentan grandes diferencias entre los distintos genotipos. Es especialmente importante, a efectos prácticos, el caso del 1,8-cineol, por ser éste el compuesto mayoritario. Se han observado grandes diferencias entre los distintos clones para este compuesto. Los genotipos D1, C3 y los tres provenientes de la población B son los que mayor cantidad de este compuesto han producido a lo largo del año. Estos ejemplares tienen picos de producción que superan el 50% del total de la esencia, llegando a un máximo registrado



de un 62,7% (tabla 17). El compuesto 1,8-cineol o eucaliptol, es un constituyente natural de numerosas especies de plantas aromáticas y de sus aceites esenciales. Las principales especies donde aparece este compuesto y los rangos descritos para sus porcentajes relativos se detallan en la tabla 20.

Tabla 20.- Contenido en 1,8-cineol de los aceites esenciales de las especies donde se ha descrito en mayor porcentaje relativo.

Especie	Nombre común	Contenido (%)	Referencia
<i>Artemisia pontica</i> L.	Ajenjo menor	12-23	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Eucalyptus globulus</i> Lab.	Eucalipto blanco	70-80	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Eucalytus camaldulensis</i> Dehnh	Eucalipto rojo	25-44	Tsiri <i>et al.</i> , 2003
<i>Eucalyptus polybractea</i> R.T. Baker	Mallee azul	>70	Goodger & Woodrow, 2009
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Romero	12-47	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Salvia officinalis</i> L.	Salvia oficial	8-23	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.	Salvia española	12-41	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
		6-59	Schmiderer <i>et al.</i> , 2008
		1-54	Giannouli & Kintzios, 2000
<i>Elettaria cardamomum</i> L.	Cárdamo	13-51	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Hedichium flavum</i> Roxb.	Jenjibre amarillo	42	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Mentha piperita</i> L.	Menta común	15-18	De Vicenci <i>et al.</i> , 2002
<i>Thymus vulgaris</i> L. [quimiotipo 1,8-cineol].	Tomillo español	36	Jordán <i>et al.</i> , 2006
<i>Laurus nobilis</i> L.	Laurel	50	Hassiotis & Dina, 2011
<i>Thymus albicans</i> Hoffm. et Link	Mejorana	50-66	Miguel <i>et al.</i> , 2004

Los porcentajes relativos encontrados en ciertos clones de *S. lavandulifolia* creciendo en un mismo ambiente se encuentran en el rango superior de las especies en las que se ha descrito un mayor porcentaje relativo para este compuesto. Además, la heterogeneidad que presentan a este respecto los clones, se pone de manifiesto de modo que, aunque en ciertas poblaciones de origen el contenido sea menor (población A), dentro de otras como la población C, existen individuos con alto y bajo contenido en 1,8-cineol. Esto indica que, aunque pueda existir una cierta adaptabilidad o plasticidad en la síntesis de este compuesto respecto a unas condiciones ambientales dadas, existe un fuerte carácter genético que finalmente será el que determine sus niveles en el aceite esencial. Además, aunque las diferencias encontradas a lo largo del año no son significativas, se aprecia claramente como los niveles más bajos de 1,8-cineol aparecen

antes de la floración y van aumentando, con un máximo en época invernal. Este hecho aparece en otras especies como el tomillo español (*Thymus vulgaris*), donde tras un estudio fenológico, los niveles más altos de 1,8-cineol en sus aceites esenciales corresponden a la época vegetativa (Jordán *et al.*, 2006).

Este compuesto ha sido descrito como uno de los responsables de la alta actividad fitotóxica frente a especies de flora arvense de importancia económica que presentan los aceite esenciales de algunas especies de *Lamiaceae* (Romagni *et al.*, 2000; Argyropoulus *et al.*, 2008; Azirak & Karaman, 2008). Por otro lado, aceites esenciales de laurel (*Laurus nobilis* L.) con porcentajes relativos de 1,8-cineol similares a los encontrados en *S. lavandulifolia* han demostrado gran capacidad inhibitoria en el desarrollo de micorrizas en otras especies (Hassiotis & Dina, 2011). Además, algunos estudios sugieren que el 1,8-cineol tiene gran capacidad antimitótica (Vaughn & Spencer, 1993; Baum *et al.*, 1998; Romagni *et al.*, 2000). Estos efectos alelopáticos podrían explicar la acumulación en las hojas de aceite esencial con un elevado contenido de 1,8-cineol a partir de la completa maduración de los frutos, durante la época otoñal. El incremento en la concentración de este compuesto a lo largo del invierno puede determinar protección frente a hongos o bacterias patógenas, así como evitar la nascencia de especies vegetales que puedan ser competencia, todo ellos mediante la incorporación de las hojas secas al suelo y/o mediante exudados radiculares. La biosíntesis de ciertos monoterpenos y diterpenos experimenta un notable aumento como respuesta a la presencia de hongos patógenos y herbívoros (Croteau *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 2003).

Por otro lado, los niveles de 1,8-cineol en algunos genotipos son comparables a los de *Eucalyptus globulus*. Las hojas secas de esta especie, y de otras del mismo género, se utilizan para evitar las picaduras de insectos y reducir las plagas agrícolas, debido a su demostrada capacidad de repulsión ante una gran variedad de invertebrados (Batish *et al.*, 2008). Ésta es la especie de la que se extrae comercialmente la mayoría de este compuesto para uso cosmético, farmacéutico y homeopático, principalmente. Los genotipos en los cuales se ha descrito un elevado contenido de 1,8-cineol han mantenido, desarrollándose en otro ambiente edafoclimático distinto al original, sus características distinguibles. *S. lavandulifolia* es una especie autóctona de la Península Ibérica, por lo tanto, está perfectamente adaptada a las condiciones edafoclimáticas del Centro y Este peninsular. Como se ha comprobado, es una especie con pocos requerimientos fertilizantes o de manejo agrícola, además de tener escasos enemigos

naturales o fitopatologías descritas (Burillo, 2003). Todos estos hechos indican que, con un proceso adecuado de selección de genotipos interesantes comercialmente y acompañado de sistemas de mejora, esta especie puede ser susceptible de ser cultivada, además de por otros fines, con el objetivo de comercialización de su aceite esencial con alto contenido en 1,8-cineol, principalmente con fines farmacéuticos (Goodger & Woodrow, 2009).

Otro compuesto, el alcanfor presenta una gran variabilidad entre los genotipos de trabajo. Hay que destacar que dos clones que provienen de la misma población son los que tienen los niveles mayores y menores de este compuesto en el aceite esencial. Esto indica que este compuesto puede tener un fuerte carácter genético en su expresión.

Para identificar patrones de evolución entre los compuestos mayoritarios durante todo el ciclo vegetativo de la especie se llevaron a cabo correlaciones por pares de componentes usando el coeficiente de correlación de Spearman. El presente estudio revela, por primera vez, que los compuestos mayoritarios que forman parte de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia*, lo hacen de manera diferencial a lo largo del ciclo biológico de la especie. La figura 14 muestra que los terpenoides mayoritarios forman tres grupos identificables a lo largo del año. El grupo 1 incluye a monoterpenos hidrocarbonados:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y mirceno. El grupo 2 incluye a monoterpenos hidrocarbonados, oxigenados y sesquiterpenos: canfeno, limoneno, alcanfor, *trans*-cariofileno y óxido de cariofileno. El grupo 3 incluye al éter monoterpénico 1,8-cineol. El análisis específico durante todo el ciclo fenológico de diferentes clones de *S. lavandulifolia* desarrollándose bajo un mismo ambiente ha permitido establecer la existencia de correlaciones entre el estado de desarrollo de las plantas y la composición química de los aceites esenciales (figura 15).

El grupo 1 tiene su máxima expresión en época de floración. Los porcentajes relativos de estos compuestos van aumentando progresivamente con el aumento de la actividad metabólica de la especie en primavera, llegando al máximo detectado en floración. Pasado este estadio, los niveles caen cuando se ha producido la polinización y comienza la maduración de las semillas. Perteneciente a este grupo, el compuesto  $\alpha$ -pineno ha sido descrito como compuesto orgánico volátil con capacidad de repulsión frente a insectos plaga de algunas especies (Maffei, 2010). El mirceno ha sido encontrado en grandes cantidad en cálices y flores inmaduras de lavanda fina (*Lavandula angustifolia*) y de lavandín (*Lavandula x intermedia*) (Guitton *et al.*, 2010). Este compuesto podría también jugar, por tanto, un papel importante en la repulsión de

insectos dañinos (Guitton *et al.*, 2010). En este estudio, el  $\alpha$ -pineno no ha sido detectado en las flores, que sin embargo tienen como compuestos mayoritarios el linalol y el acetato de linalilo. Estos dos compuestos son característicos de los aceites esenciales de lavandas, espliegos y lavandines recolectados en plena floración en las mismas parcelas en la que se ha llevado a cabo este trabajo con *S. lavandulifolia* (Usano-Alemanly *et al.*, 2011). En estas especies, las espigas florales son más altas y con mayor número de flores que en *S. lavandulifolia*, lo cual trae como consecuencia que a la hora de la recolección se cosechen mayor número de flores y, en consecuencia, menor número de hojas que en la salvia española. En el caso de las lavandas, la recolección es en la práctica totalidad de tallos y flores, mientras que en la salvia española mayoritariamente se recolectan hojas y algunas flores. Es por este motivo que aunque estos compuestos sean mayoritarios en las flores, incluso en el momento de la recolección, apenas son detectados en el aceite esencial de salvia. En oposición a nuestros resultados, Schmiderer *et al.* (2008) no describen diferencias cualitativas entre los aceites esenciales de las diferentes partes de la especie en floración. Análisis por microextracción sólido-fase (SPME) de tricomas glandulares de anteras, corola, cáliz, hojas jóvenes y maduras de una planta cultivada en invernadero no revelan la presencia de linalool ni de acetato de linalilo. Las anteras presentan como compuestos mayoritarios el limoneno y  $\beta$ -pineno. La corola posee mayoritariamente borneol, limoneno y 1,8-cineol. Del cáliz se extraen principalmente  $\beta$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol. Finalmente, las hojas tienen al 1,8-cineol y al alcanfor como compuestos mayoritarios. El hecho de que coincida la composición química de las flores de *S. lavandulifolia* cultivadas en Cuenca con lo descrito para lavandas y lavandines, hace indicar que estos compuestos (linalol y acetato de linalilo, junto con borneol y  $\beta$ -(E)-ocimeno) jueguen un papel importante en procesos de polinización en estos ambientes. Respecto a los compuestos del grupo 1, el hecho de que sean producidos en las hojas y no en las flores, sugiere que, aún teniendo su máximo de producción en floración, no juegan un papel relevante a efectos de polinización sino que más bien, pueden tener un papel de protección frente a insectos dañinos u otras infecciones.

El grupo 2, formado por los compuestos canfeno, limoneno, alcanfor, *trans*-cariofileno y óxido de cariofileno, tienen máximos porcentajes tanto antes del comienzo de la floración (Abril), como cuando comienzan a madurar las semillas (Agosto). Compuestos como alcanfor (Kordali *et al.*, 2007), *trans*-cariofileno (He *et al.*, 2006; Rasmann *et al.*, 2005) y limoneno (Verheggen *et al.*, 2008) muestran capacidad

repelente frente a insectos patógenos, atracción de depredadores o de nemátodos entomopatógenos cuando estos compuestos son exudados por las raíces. Una vez más, estas oscilaciones de los terpenoides sugieren una función ecológica de protección frente a patógenos y/o herbívoros.

El grupo 3 está formado por el compuesto 1,8-cineol. Éste es el principal compuesto de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia*. Su dinámica en la producción muestra cómo a partir de la floración el porcentaje relativo en el aceite esencial va aumentando de manera progresiva con un máximo en invierno cuando la especie está en estado de baja actividad metabólica. Además, este patrón muestra una correlación negativa con el resto de compuestos evaluados (figura 14). Sin embargo, en *Lavandula angustifolia* Mill. este compuesto está correlacionado positivamente con otros como limoneno, borneol, o mirceno durante el desarrollo de las inflorescencias (Guitton *et al.*, 2010), atribuyéndoles funciones de repulsión frente a insectos dañinos. En todo caso, el 1,8-cineol no es un compuesto mayoritario en los aceites esenciales de las lavandas en general (lavandas, lavandines), aunque en el espliego, en ciertas ocasiones, lo es. Normalmente, él o los compuestos mayoritarios de las esencias durante la época de floración descienden en sus porcentajes relativos porque aparecen otros compuestos, que a su vez, en época de postfloración y parada vegetativa, descienden drásticamente. En estos procesos pueden estar implicados efectos sinérgicos, sea cual fuere la función ecológica que puedan llevar a cabo.

Uno de los principales objetivos de este trabajo es evaluar la fijación de las características químicas de los aceites esenciales en *S. lavandulifolia* mediante el desarrollo en un mismo ambiente de diversos clones provenientes de poblaciones naturales distintas. Tras un periodo de adaptación al nuevo ambiente de crecimiento después de la implantación en cultivo, se extrajeron los aceites esenciales en 6 ocasiones durante un año. Un análisis PCA basado en las 66 muestras recolectadas de los 11 clones evaluados muestra una distribución de las recolecciones agrupadas conforme al genotipo original de salvia española del que proceden (figura 13). Esta distribución indica que cada clon no sólo ha mantenido su identidad química ante las nuevas condiciones bio-edafo-climáticas de crecimiento, sino que las fluctuaciones descritas durante el ciclo biológico de la especie tienen poca influencia conforme a la composición química de los aceites esenciales si lo comparamos con el componente genético. Así, en cualquier momento del año en que sea extraída la esencia, la composición química mantiene el mismo patrón que el que fue descrito para las

poblaciones naturales de las que provienen (figuras 11 y 12). Los clones provenientes de los genotipos A3, C1 y C2 han seguido siendo los que más se diferencian entre sí y con el resto. Cabe destacar el caso del clon A2, el cual en los estudios poblacionales se agrupaba junto a las poblaciones B y D, pero que, tras este periodo de crecimiento en un nuevo ambiente, ha adaptado su composición química y ahora aparece como un grupo independiente.

Estos resultados indican que el componente genético es determinante a la hora de la expresión de los aceites esenciales en *S. lavandulifolia*. La composición química de los aceites esenciales no ha mostrado cambios cualitativos debido a factores ecológicos o climáticos, confirmando que los quimiotipos mantienen los patrones que los hacen reconocibles. Esta fijación de caracteres avala la utilidad de la técnica tradicional de la selección de nuevos cultivares dentro de la riqueza genética de las poblaciones naturales. Estudios similares han demostrado la estabilidad química de los aceites esenciales en clones derivados de poblaciones naturales en *Thymus x oblongifolius* Opiz (Loziene & Venskutonis, 2010). Además, por regla general, los cultivos de plantas aromáticas muestran gran estabilidad en la composición química de los aceites esenciales a lo largo de los años (Drazic & Brkic, 2001).

Los ecotipos son poblaciones de la misma especie que se desarrollan en diferentes localidades geográficas y que normalmente no son identificados hasta que no se realiza un análisis químico de sus extractos. Posteriormente, estudios sobre la fijación de estos caracteres pueden dar lugar a la descripción de quimiotipos. Frecuentemente, ecotipos de la misma especie creciendo en áreas distintas se pueden identificar como quimiotipos. Desde un punto de vista bioquímico, los quimiotipos son frecuentemente genotipos (Barra, 2009). Los estudios quimiotaxonómicos con especies vegetales en los cuales se utilicen aceites esenciales deben contar, en primer lugar, con una correcta identificación de la especie, y en segundo lugar un análisis de los aceites esenciales en diferentes estados fenológicos y con diferentes condiciones edáficas y/o climatológicas (Franz, 1993). De este modo puede contemplarse la posibilidad de que las diferencias sean causadas por factores edáficos, estacionales o climatológicos. Además, las variaciones en composición química observada no deberían ser asignables a factores propios de la toma de muestras, de su preparación o de su análisis. Por último, todos los estudios y conclusiones quimiotaxonómicos deben estar basados en material vegetal comparable, creciendo y desarrollándose bajo las mismas circunstancias bioclimáticas. (Franz & Novak, 2010). Sin embargo, muchos estudios

quimiotaxonómicos o referentes a dilucidar factores que pueden afectar a la composición química de los aceites esenciales no tienen en cuenta alguno o algunos de los condicionantes citados para obtener resultados contrastables.


El estudio de los quimiotipos es especialmente adecuado cuando la utilidad de una especie se basa en las propiedades de algunos de los compuestos y cuyas concentraciones entre los distintos individuos puede variar de forma notable (Soria *et al.*, 2008). Éste es el caso de *S. lavandulifolia*, cuya utilidad como especie cultivable se basa en la composición química de sus aceites esenciales y en el uso de sus hojas secas. Estudios genéticos y mediante hibridaciones muestran que la composición química de los aceites esenciales se encuentra, fundamentalmente, bajo control genético (Figueiredo *et al.*, 2008).

Mediante el procedimiento estadístico descrito por Soria *et al.* (2008) para la descripción de quimiotipos, 5 compuestos presentan agrupaciones significativas a este respecto. Descartando variaciones conforme a factores bio-edafo-climáticas, los compuestos canfeno, limoneno, 1,8-cineol, *trans*-cariofileno y espatulenol pueden considerarse como marcadores para detectar la presencia de quimiotipos en esta especie (tabla 18). Dentro de estos compuestos hay que tener en cuenta las correlaciones positivas existentes entre el canfeno y el limoneno, y entre este último y el *trans*-cariofileno. Para los compuestos *trans*-cariofileno y limoneno la agrupación usando el método de k-medias y la  $D_{mah}$  como medida de diferencia, muestra cómo uno de los grupos formados se identifica concretamente con algunos de los clones. Los grupos NG1 para limoneno y *trans*-cariofileno están formados por 7 y 14 muestras, respectivamente. Estas muestras se corresponden con los clones A3 para limoneno y A3 y C2 para *trans*-cariofileno. A pesar de que las muestras de C2 no se agrupan bajo este criterio junto con las de A3 para el limoneno, sus porcentajes relativos pueden determinarse como altos en comparación con el resto de clones evaluados, como puede apreciarse también en la tabla 11. Por ello, estos dos genotipos podrían englobar un quimiotipo denominado “limoneno/*trans*-cariofileno”, con porcentajes relativos medios de alrededor del 17 y del 11%, respectivamente. Otro quimiotipo denominado “espatulenol”, que podría deducirse tras este criterio de agrupación es el que engloba el clon C1. Este quimiotipo está caracterizado por porcentajes relativos medios de alrededor del 4%. Los otros dos compuestos cuyos  $D_{mah}$  son superiores al valor crítico son canfeno y 1,8-cineol. En estos dos compuestos se puede observar cómo la distribución de las muestras en los dos grupos proviene tanto de los genotipos como de

los momentos del año en que han sido recolectados. La tabla 21 muestra esta distribución para el compuesto 1,8-cineol. Este hecho hace pensar que en la biosíntesis de estos dos compuestos el estado fenológico y/o las condiciones ambientales tienen mayor influencia que para los otros compuestos. Por otro lado, y base a los resultados obtenidos, el quimiotipo 1,8-cineol estaría definido por porcentajes relativos medios de alrededor del 50%.

Los resultados obtenidos durante el año 2011 apoyan esta afirmación. Aunque los efectos del estrés hídrico son más notables en relación al rendimiento, también se ha constatado cierta influencia en la calidad final obtenida.

Tabla 21.- Agrupación del compuesto 1,8-cineol según la metodología expuesta de validación para la presencia de quimiotipos.

COMPUESTO			Mes de recolección					
			Febrero	Abril	Junio	Agosto	Octubre	Diciembre
1,8-cineol 	Clon	HSD	A	C	B	B	AB	AB
	A2	de	37,9	24,5	13,3	24,5	25,2	18,3
	A3	e	25,5	17,7	18,4	11,6	16,1	5,7
	B1	bc	53,1	16,8	38,2	42,7	46,7	43,7
	B2	bc	47,9	17,5	41,0	43,2	44,3	42,7
	B3	ab	51,8	27,8	43,3	49,4	48,8	57,0
	C1	de	29,6	13,8	17,3	24,9	38,6	31,6
	C2	e	24,2	18,2	11,3	8,2	15,6	15,0
	C3	ab	54,1	31,3	40,6	42,1	56,2	52,1
	D1	a	62,7	48,8	52,5	49,1	56,8	54,3
	D2	cd	46,0	22,0	24,3	34,4	37,2	31,2
	D3	abc	49,5	10,8	49,2	50,6	47,5	43,0

Las casillas sombreadas de color verde definen las muestras que forman parte del grupo NG1 ( $\mu=19,74\%$ ). El resto de las casillas definen las muestras que forman parte del grupo NG2 ( $\mu=47,13\%$ ). El método utilizado para la definición de grupos ha sido el de k-medias y para indicar la diferencia entre grupos la  $D_{mah}$

Después de un periodo de estrés hídrico prolongado, durante la época de maduración de las semillas aumentan significativamente los monoterpenos oxigenados y disminuyen los sesquiterpenos hidrocarbonados y los monoterpenos hidrocarbonados (tabla 19). El aumento de los monoterpenos oxigenados se debe, principalmente, al 1,8-cineol. Bajo estas condiciones el porcentaje relativo medio de este compuesto asciende



hasta el 54,2%, llegando en algunos genotipos hasta valores cercanos al 70%. Tal y como se ha propuesto en la figura 13, este compuesto está negativamente correlacionado con el resto de compuestos mayoritarios, y un aumento en su biosíntesis trae como consecuencia un descenso de canfeno, limoneno,  $\beta$ -pineno + mirceno, alcanfor y *trans*-cariofileno, principalmente. Sin embargo, parece que un estrés hídrico moderado durante la época de floración no ha tenido efectos en la calidad del aceite esencial obtenido. La reducción del aporte hídrico en cultivos de orégano (*Origanum vulgare*) después del comienzo de la floración reduce la producción final de material vegetal seco pero aumenta el contenido de aceite esencial, no afectando a su calidad (Azizi *et al.*, 2009). En otras especies como la lavanda (*Lavandula angustifolia*) sí se han descrito diferencias en cuanto al rendimiento y el contenido de linalol (compuesto mayoritario) entre los distintos años en que se repitieron los experimentos (Zheljazkov *et al.*, 2012). Por otro lado, un aumento de los sesquiterpenos en relación a los monoterpenos con el incremento de las temperaturas medias anuales es atribuido a la diferente volatilidad de los constituyentes que conduce a una alteración del ratio entre ellos (Gil *et al.*, 2007).

### **IV.3. DIVERSIDAD EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TALLOS, HOJAS Y FLORES DE *Salvia lavandulifolia* Vahl.**

#### **IV.3.1. Introducción**

Son muchos los trabajos que describen la composición química de los aceites esenciales u otros metabolitos secundarios de las plantas. El objetivo principal, en la mayoría de los casos, es evaluar las actividades biológicas de estos extractos para aplicaciones farmacológicas o terapéuticas. Estos estudios aportan nueva información y perspectivas sobre potenciales usos de estos productos naturales. Sin embargo, en la bibliografía se puede encontrar gran discordancia entre las esencias de una misma especie. La razón fundamental son los anteriormente citados polimorfismos químicos de las esencias, los cuales son debidos a la interacción de factores genéticos, ambientales y culturales. Además, la edad de la planta y las partes que de ella se utilicen para la extracción de los aceites esenciales puede condicionar en gran medida la composición química resultante (Perry *et al.*, 1999; Hudaib *et al.*, 2002; Lahlou & Berrada, 2003).

Más concretamente, numerosos autores han descrito grandes diferencias en la familia *Lamiaceae* en cuanto a la biosíntesis de aceites esenciales y su composición química entre hojas jóvenes y maduras y entre éstas y las flores, lo cual influye significativamente en la calidad de las esencias producidas (Franz & Novak, 2010).

Todos estos condicionantes determinarán la composición química de los aceites esenciales y, en definitiva, su calidad como materia prima. Como consecuencia de ello, su conocimiento en cada especie cultivada determinará la manera y época idónea para su recolección, así como las partes del vegetal que sean de mayor interés comercial.

Aunque en algunas especies la composición química de los aceites esenciales aislados de sus diferentes órganos es similar, las características químicas pueden depender en gran parte de los órganos que se utilicen o de la proporción generada entre estos en la materia prima utilizada en el momento de la extracción. Las partes de las plantas utilizadas para la obtención de aceites esenciales (partes verdes, flores, semillas, frutos o raíces) pueden ser considerados factores endógenos de variación, ya que están relacionadas con diferencias anatómicas y fisiológicas (Barra, 2009). En muchas especies, estos cambios en el rendimiento y composición química de los aceites esenciales son especialmente significativos desde el comienzo de la floración hasta la

maduración completa de las flores o hasta la formación de los frutos. Estos cambios están asociados al estado de maduración y correlacionan la biosíntesis de aceites esenciales con la formación de estructuras secretoras, lo cual desencadena, por ejemplo, cambios en el ratio de compuestos cíclicos o el incremento de compuestos oxigenados (Figueiredo *et al.*, 2008). Además, la localización y naturaleza de las estructuras secretoras es diferente entre especies. Por ejemplo, en la familia *Lamiaceae* las estructuras secretoras características son los tricomas glandulares localizados en las partes aéreas de las plantas. Sin embargo, en el género *Citrus*, perteneciente a la familia *Rutaceae*, los aceites esenciales se almacenan en cavidades creadas por lisogenia celular, localizándose éstas en las hojas y en el epicarpio de los frutos (Svodoba *et al.*, 2000).

La salvia española (*Salvia lavandulifolia* Vahl.) es cultivada principalmente por su aceite esencial, el cual es apreciado tanto por industrias perfumeras como en farmacia y parafarmacia. Además, de esta especie son también comercializadas sus hojas secas. El principal objetivo de este trabajo es mostrar las diferencias en cuanto a la composición química entre las diferentes partes aéreas (hojas, tallos y flores) de *S. lavandulifolia* en estado de plena floración y en condiciones de cultivo en secano.

### **IV.3.2. Material y Métodos**

#### **IV.3.2.1. Material vegetal**

El material vegetal escogido para estos ensayos provino de plantas cultivadas en los campos de experimentación con plantas aromáticas y medicinales del C.I.A de Albaladejito (Cuenca). Este trabajo se realizó durante la campaña de 2010. Se utilizaron las mismas microparcels descritas para los ensayos con fertilización nitrogenada (**Estudio IV.4.**), concretamente, el material vegetal recolectado provino de las microparcels control en estado de plena floración. Una vez realizada la recolección se procedió al secado del material vegetal previo a la separación de sus partes y de la destilación por hidrodestilación. Los resultados expuestos son los resultados medios de tres repeticiones, en cada uno de los casos.

#### IV.3.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales

Del material vegetal recolectado de las microparcels control se separaron las flores, los tallos y las hojas, previamente secadas a temperatura ambiente en el laboratorio. De cada una de las partes de la planta se procedió a la extracción por separado de los aceites esenciales.

Tanto la extracción como los análisis de los aceites esenciales se llevaron a cabo conforme a la metodología descrita en los apartados de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES (III.1. y III.2., respectivamente).

#### IV.3.3. Resultados

Se presenta en la tabla 22 la composición química de los aceites esenciales de las hojas, los tallos y las flores de *Salvia lavandulifolia* Vahl. Fueron identificados un total de 20 compuestos, que representaron un total identificado del 88,5%, 88,7% y del 89,5%, respectivamente. Las hojas contienen mayoritariamente 1,8-cineol (40,1%). Contienen, además, una serie de compuestos en porcentajes relativos que van desde el 3,3% al 7,6%. Estos compuestos representativos son  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno + mirceno,  $\gamma$ -terpineno, alcanfor, borneol, *trans*-cariofileno y biciclogermacreno. Los mismos compuestos, aunque con ciertas diferencias cuantitativas, son lo que caracterizan el aceite esencial extraído de los tallos. Sin embargo, en este caso el porcentaje relativo de 1,8-cineol es algo superior (45,2%). Los restantes compuestos representativos son los mismos que aparecen en las hojas, aunque cabe destacar el alto porcentaje relativo detectado de alcanfor (11%).

La composición química de los aceites esenciales extraídos de las flores es radicalmente distinta a la descrita para hojas y tallos. En este caso, las flores contienen mayoritariamente linalol y acetato de linalilo (36,9% y 17,9%, respectivamente). Otros compuestos representativos, aunque con menores porcentajes relativos, son  $\beta$ -pineno + mirceno, limoneno,  $\beta$ -(*E*)-ocimeno y el diterpeno manool.

En este aceite esencial los monoterpenos representan casi el 85% del total identificado, quedándose en porcentajes alrededor del 80% en hojas y tallos. En ninguna de las partes analizadas los sesquiterpenos superaron el 10% de porcentaje relativo.

Tabla 22.- Composición química de los aceites esenciales de las diferentes partes de *S. lavandulifolia*.

Compuesto	I.K	Hojas	Tallos	Flores
$\alpha$ -tuyeno	943	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	-
$\alpha$ -pineno	962	6,8 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 0,8	-
canfeno	981	3,0 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2	-
$\beta$ -pineno + mirceno	1033	7,3 $\pm$ 0,9	5,1 $\pm$ 0,7	4,0 $\pm$ 0,4
<i>p</i> -cimeno	1038	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1
limoneno	1044	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,1
1,8-cineol	1066	40,1 $\pm$ 3,4	45,2 $\pm$ 4,1	-
$\beta$ -( <i>E</i> )-Ocimeno	1079		0,1 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,9
$\gamma$ -terpineno	1102	5,4 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,2
terpinoleno	1165	-	-	1,4 $\pm$ 0,2
linalol	1187	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	36,9 $\pm$ 2,1
alcanfor	1206	6,8 $\pm$ 0,8	11,0 $\pm$ 1,1	-
borneol	1296	7,6 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,3	10,1 $\pm$ 1,6
$\alpha$ -terpineol	1355	0,5 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2
acetato de linalilo	1441	-	-	17,9 $\pm$ 1,8
$\alpha$ -cubebeno	1477	-	-	1,9 $\pm$ 0,3
<i>trans</i> -cariofileno	1491	3,3 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2
biciclogermacreno	1519	5,4 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,1
óxido de cariofileno	1621	1,1 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
manool	1682	-	-	3,0 $\pm$ 0,6
% Total identificado y representado		88,5	84,9	89,5
Monoterpenos		78,7	80,9	84,3
Sesquiterpenos		9,8	7,8	2,2
Diterpenos		-	-	3,0

#### IV.3.3. Discusión

Aunque se han citado varias especies en las que la composición química de los aceites esenciales es similar entre sus diferentes partes, las características químicas de los aceites esenciales pueden variar de manera notable dependiendo de la parte del vegetal de la cual se aíslan: flores, partes verdes (hojas y tallos), frutos, semillas o raíces (Lawrence, 2002). Esta variabilidad parece ser particularmente evidente en flores

entomófilas, donde los compuestos volátiles pueden funcionar como método de orientación para los insectos (Figueiredo *et al.*, 2008). A este respecto, se ha descrito que los aceites esenciales de *Salvia officinalis* extraídos de las flores son ricos en  $\beta$ -pineno, mientras que los de las hojas contienen mayoritariamente tuyonas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Perry *et al.*, 1999; Santos-Gomes & Ferreira, 2001). La composición química de las esencias producidas por las distintas partes de *Salvia lavandulifolia* muestra cierta variabilidad. Así, las anteras, la corola, el cáliz, y las hojas jóvenes o maduras, tienen ligeras diferencias cuantitativas en cuanto a la composición química (Schmiderer *et al.*, 2008). Nuestros resultados se contraponen de manera llamativa a los descritos por los citados autores. Los tallos y las hojas tienen ligeras diferencias cuantitativas en su composición, mientras que la composición química encontrada en las flores varía, además, de manera cualitativa. El aceite esencial de las hojas y los tallos tiene identidad similar a lo descrito como representativo de *S. lavandulifolia* (Lawrence, 1990). Las hojas y tallos muestran como principal componente 1,8-cineol, mientras que la composición química de los aceites esenciales extraídos de las flores tiene como compuestos mayoritarios linalol y acetato de linalilo. Estos dos compuestos, cuando son citados, lo son únicamente con proporciones traza, tanto en el referido trabajo como en otras descripciones químicas de los aceites esenciales de esta especie (Marcos *et al.*, 1988; Lawrence, 1990; Guillén *et al.*, 1996; Guillén & Manzanos, 1999; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010), además de en la normativa vigente sobre la calidad del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (UNE 84310/2001). Únicamente Giannouli & Kintzios (2000), en su recopilación descriptiva sobre la composición química de los aceites esenciales de esta especie, cita una referencia con un porcentaje relativo de 35% de linalol y un 6% de acetato de linalilo. Estos dos compuestos mayoritarios de las flores coinciden con los descritos para otras especies cultivadas bajo las mismas condiciones y recolectadas en plena floración. Éste es el caso de la lavanda (*Lavandula angustifolia*) y de los lavandines (*Lavandula x intermedia*) (Usano-Aleman *et al.*, 2011). Además, el espliego (*Lavandula latifolia*), que comparte hábitat con la salvia española, tiene como compuesto mayoritario en las flores el linalol (Guillén *et al.*, 1996; Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007). Los insectos fitófagos usan los compuestos volátiles de las plantas para diferenciar las que son susceptibles de ser huéspedes de las que no lo son (Bernays & Chapman, 1994). De una amplia variedad de aceites esenciales de plantas que no son huéspedes de *Meligethes aeneus*, la lavanda (*Lavandula angustifolia*) ha demostrado ser la que tiene más capacidad de repulsión en ensayos de laboratorio

(Mauchline *et al.*, 2005). El linalool es un compuesto cuya biosíntesis puede ser inducida como mecanismo de defensa frente a procesos de estrés biótico en las plantas (Maffei, 2010). Este compuesto, junto con el acetato de linalilo, se muestra como un excelente repelente frente a *Meligethes aeneus* (Coleoptera, Nitidulidae), el cual causa gran daño en especies de *Cruciferae* en cultivo, como la colza (*Brassica napus* L.) (Maffei, 2010). Pero tanto el linalool como el acetato de linalilo son compuestos bastante comunes entre los volátiles del reino vegetal y, a diferentes concentraciones, pueden mostrar tanto efectos atrayentes como repulsores frente a una gran variedad de insectos (Mauchline *et al.*, 2008). El hecho de obtener una elevada proporción de estos dos compuestos en los aceites esenciales aislados de las flores de *S. lavandulifolia*, *L. angustifolia*, *L. latifolia* y *L. x intermedia*, cultivados bajo las mismas condiciones, hace indicar que pueden jugar un mismo papel ecológico durante la época de floración. La biosíntesis de estos compuestos, por tanto, parece estar determinada por su función biológica en los procesos relacionados con la polinización y/o repulsión de insectos fitopatógenos en el momento de la floración. Esta afirmación también se basa en el hecho de que, a lo largo del ciclo fenológico, únicamente se han detectado estos compuestos en proporciones traza en las partes aéreas recolectadas (**Estudio IV.2.**). En las especies en que los porcentajes relativos de ciertos compuestos representativos varían considerablemente respecto a las distintas partes de la planta como son las flores, los tallos o las hojas, parece razonable pensar que el quimiotipo o calidad resultante de la destilación de la planta tomada en su conjunto varíe significativamente dependiendo del ratio que tengan estas partes del vegetal en la materia prima. Esta nueva fuente de variabilidad podría explicar la dificultad que existe en adscribir una planta determinada a uno u otro quimiotipo cuando se realizan determinaciones químicas puntuales en el estadio de floración.

#### IV.4 INFLUENCIA DEL ABONADO NITROGENADO EN EL RENDIMIENTO Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *S. lavandulifolia*

##### IV.4.1. Introducción

El cultivo de plantas aromáticas abarca desde especies de plantas anuales, bianuales o hierbas perennes, hasta matorrales e incluso árboles. Estas especies son cultivadas en todo tipo de biomas (áreas tropicales y subtropicales, regiones mediterráneas e incluso zonas áridas). La influencia de los aportes nutritivos a la hora del desarrollo de estos cultivos en cuanto a la generación de biomasa ha suscitado mucho interés en los últimos años. Obviamente, la cantidad de aceite esencial producido está en relación directa con la biomasa vegetal. En la mayoría de los cultivos, una fertilización óptima y un aporte hídrico adecuado dan como resultado un mayor desarrollo de la biomasa vegetal y, por lo tanto, mayor cantidad de aceite esencial destilado. Sin embargo, diversos estudios indican que el rendimiento sólo está parcialmente relacionado con el vigor de la planta y la actividad metabólica (Franz & Novak, 2010). Además, existen descripciones de que mayores biomásas dan como resultado menores rendimientos en aceite esencial (Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira, 2001).

El aporte de fertilizantes minerales al suelo, en general, depende del tipo de suelo y del grado de fertilización existente *a priori* en el área de cultivo. Un aporte suficiente de nitrógeno al suelo incrementa la eficiencia fotosintética y permite un mayor desarrollo vegetal. Este hecho trae como consecuencia un incremento en la biomasa y en las tasas metabólicas, lo cual produce directa o indirectamente, un incremento en la producción, desarrollo y acumulación de metabolitos primarios y secundarios (Sifola & Barbieri, 2006). Algunos autores consideran que el tipo de suelo y su composición mineral y nutricional como los factores determinantes en cuanto a la biosíntesis de ciertos metabolitos secundarios, en particular de los compuestos volátiles, como explicación a las diferencias encontradas entre los aceites esenciales de una misma especie. De acuerdo con Hornok (1988), los suplementos al suelo con los tres principales nutrientes (nitrogeno, fósforo y potasio) generalmente incrementan los rendimientos en aceite esencial, aunque la adición exclusiva de cualquiera de ellos ocasiona resultados diferentes tanto en rendimientos como en composición química



para una misma especie. Por otro lado, algunos estudios realizados en poblaciones naturales de especies como *Thymus spinulosus* (De Feo *et al.*, 2003), *Eringium campestre* (Palá-Paúl *et al.*, 2008), *Rosmarinus officinalis*, *Cistus albius* y *Pinus halepensis* (Ormeño *et al.*, 2007) o *Cistus monspeliensis* (Robles & Garzino, 1999), entre otras, sugieren que las diferencias edáficas pueden ser las responsables, en gran parte, de la variabilidad fitoquímica descrita.

El manejo de la fertilización nitrogenada en los cultivos es muy importante para la optimización de las producciones. El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes, ya que afecta a la eficacia fotosintética y al desarrollo foliar (Dordas & Sioulas, 2008). De la aplicación de fertilización nitrogenada no se han obtenido resultados claros en cuanto al desarrollo de las plantas, rendimiento y composición química de los aceites esenciales. En algunos casos no se ha encontrado efecto alguno, como en los descritos por Economakis *et al.* (1999) en *Origanum dictamnus*. Arabaci & Bayram (2004) describen que la aplicación de nitrógeno incrementa la biomasa cultivada de *Ocimum basilicum*, pero no su rendimiento en aceite esencial. Por otro lado, Martinetti *et al.* (2006) en *Rosmarinus officinalis* y Barreyro *et al.* (2005) en variedades de orégano, muestran como la fertilización nitrogenada tiene efectos positivos sobre la biosíntesis de aceites esenciales, pero que ésta no afecta a su calidad final. Sin embargo, la aplicación de nitrógeno al suelo mejoró tanto la calidad como la cantidad de aceite esencial destilado de *Melissa officinalis* L. (Abbaszadeh *et al.*, 2009). Además, los aportes adicionales de nutrientes minerales como el nitrógeno o el fósforo pueden influir en el desarrollo de las plantas, por ejemplo, retardando la floración (Menary, 1994), lo cual puede tener efectos negativos a la hora de la gestión y manejo del cultivo además de modificar la composición química de los aceites esenciales obtenidos. Finalmente, otros autores indican que los factores ambientales como por ejemplo las características del suelo, el estrés hídrico o la temperatura, generalmente tienen su influencia en la productividad de las respectivas especies, es decir, en el rendimiento en aceite esencial, pero condicionan de manera muy limitada las rutas metabólicas que dan lugar a la biosíntesis y, por lo tanto, su composición química y su calidad final (Figueiredo *et al.*, 1997; Salamon, 2007).

Los numerosos factores que afectan o son sensibles a la hora de la producción de compuestos terpénicos en las plantas representan un gran obstáculo para el desarrollo de modelos capaces de predecir cantidad y calidad de los metabolitos secundarios sintetizados bajo diferentes condiciones ambientales. A pesar de ello,

existen ciertos estudios que demuestran que los factores ambientales se encuentran jerárquicamente subordinados a la determinación genética (Hamilton *et al.*, 2001) y, que aunque factores ambientales como las propiedades del suelo, el estrés hídrico o la temperatura, tienen influencia en la biosíntesis de aceites esenciales, tienen sólo un efecto muy limitado en la composición química (Salamon, 2007; Franz & Novak, 2010). La mayoría de especies de plantas aromáticas que se cultivan en España son especies con pocos requerimientos nutricionales y pueden crecer en suelos pobres y pedregosos. Esto hace que, en general, las necesidades de aportes nutricionales al suelo sean escasas, reduciendo así los costes de su cultivo en comparación con otras explotaciones. El principal objetivo de este trabajo es el de determinar si la aplicación de nitrógeno durante dos campañas seguidas a plantas de *S. lavandulifolia* puestas en cultivo tiene efectos sobre el rendimiento y composición química de los aceites esenciales extraídos mediante hidrodestilación. El abonado nitrogenado es uno de los más comunes usados en las prácticas agrícolas, por lo tanto, estos resultados contribuirán a mejorar el conocimiento sobre este cultivo y a optimizar su manejo para una mayor eficacia y rentabilidad de las explotaciones.

#### **IV.4.2. Material y Métodos**

##### **IV.4.2.1. Material vegetal y diseño experimental**

Para este ensayo, desarrollado en las parcelas de experimentación con plantas aromáticas del C.I.A de Albaladejito, se han utilizado microparcels cultivadas con *Salvia lavandulifolia*. Las dimensiones de las microparcels fueron de 75 m<sup>2</sup>, con una separación entre líneas de 1,5 m (5 líneas/microparcels) y una distancia entre pies de planta de 0,6 m. En este caso, el material de partida no procede de individuos concretos multiplicados vegetativamente en invernadero mediante el estaquillado de esquejes, sino de semillas procedentes de poblaciones naturales sin corresponder una determinada microparcels a una población (ya que en las sucesivas reposiciones de marras en los primeros años del cultivo se pudo utilizar material vegetal distinto al original). El material vegetal de partida, por tanto, no ha sido seleccionado previamente. En el momento de comenzar los ensayos en el año 2010 la plantación contaba con una antigüedad de 4 años, por lo que el ensayo comenzó en el momento de plena producción descrita para esta especie por Burillo (2003). Destacar que desde la

implantación del cultivo hasta el comienzo de este trabajo, las microparcels no recibieron tratamiento fertilizante alguno, salvo una enmienda orgánica de fondo previa a la implantación y común a todas ellas.

El diseño experimental en *split-plot* con tres repeticiones al azar, se desarrolló con el fin de valorar la influencia del abonado nitrogenado en la producción y composición química de los aceites esenciales producidos cuando el cultivo se encuentra en el estadio de plena floración. Para ello, se diseñó un experimento con un factor de fertilización nitrogenada con cuatro niveles de dosis. El fertilizante nitrogenado empleado fue nitrato amónico comercial. Los cuatro niveles empleados fueron los siguientes: 65 U.F/ha, 45 U.F/ha, 20 U.F/ha y un testigo sin aporte de abono; sabiendo que: U.F/ha = Unidades de fertilización por hectárea y que 1 U.F equivale a 1 kg de N<sub>2</sub>. En las dos campañas en que se repitió el experimento, se cosechó la parte aérea de las plantas cuando éstas estaban en plena floración. La cosecha se realizó de manera mecánica con una barra guadañadora. El material vegetal proveniente de cada una de las microparcels fue tratado por separado en cuanto a su destilación y análisis. En cada una de las cosechas y microparcels se calculó el rendimiento en esencia y se analizó su composición química.

#### **IV.4.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales**

Tanto la extracción como los análisis de los aceites esenciales se llevaron a cabo conforme a la metodología descrita en los apartados de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES (III.1. y III.2., respectivamente).

#### **IV.4.2.3. Análisis de datos**

Las diferencias en los rendimientos en aceite esencial de las microparcels que representan los distintos tratamientos fueron analizadas como medidas repetidas en un análisis ANOVA. Para ello, la dosis de abonado nitrogenado determina el factor en estudio que aparece en cuatro niveles (tres dosis de abonado y un control). Los años o campañas agrícolas, que normalmente representan diferentes condiciones agronómicas que no pueden ser reproducidas, son considerados como la variable repetición. Con ello se pretende, en primer lugar, analizar la igualdad de los efectos medios de los cuatro niveles del factor en relación al rendimiento en aceite esencial. En segundo lugar, si

existe o no variación en los efectos medios de los rendimientos a lo largo de las dos campañas en que se ha repetido el experimento. Por último, analizar si existe interacción entre las dosis de abonado nitrogenado y las campañas agrícolas. En relación a la composición química, se evaluó la significación de las medias de los porcentajes relativos de los compuestos más importantes obtenidos entre las dos campañas. Ésta se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), seguido de test de comparaciones múltiples (LSD) entre los grupos de tratamiento para diferencias consideradas significativas ( $P < 0,05$ ).

#### IV.4.3. Resultados

##### IV.4.3.1. Rendimiento en aceite esencial

Se presentan en la tabla 23 los resultados de rendimientos en aceite esencial en cultivo de *S. lavandulifolia* aplicando distintas dosis de abonado nitrogenado respecto de un control.

Tabla 23.- Rendimientos en aceite esencial (%) de *S. lavandulifolia* en las parcelas de experimentación con dosis de abonado nitrogenado.

Año	Control	20 U.F/ha	45 U.F/ha	65 U.F/ha
2010	0,57	0,72	0,55	0,52
2010	0,84	0,31	0,26	0,87
2010	0,55	0,36	0,92	0,77
2011	1,50	0,85	0,82	1,31
2011	1,63	0,86	0,83	1,69
2011	0,96	0,77	1,50	0,80

En las dos campañas están expuestos los resultados de rendimientos de las tres repeticiones de cada una de las microparcels con los distintos tratamientos.

Estos experimentos se han repetido durante dos años. Los resultados muestran una amplia variabilidad en la producción de esencia. El análisis de ANOVA de medidas repetidas muestra que la diferencias en el rendimiento en aceite esencial entre las distintas microparcels es significativa para el año de cosecha ( $F = 18,82$ ;  $p < 0,01$ ). Sin embargo, no se obtienen diferencias significativas ni para la dosis de abono nitrogenado ( $F = 2,01$ ;  $p = 0,15$ ), ni para la interacción del año de cosecha con la dosis de abono ( $F = 0,36$ ;  $p = 0,38$ ). Por lo tanto, el aporte a *S. lavandulifolia* en cultivo de nitrato amónico parece no tener efectos significativos en relación a la biosíntesis de aceite

esencial medido como rendimiento en volumen por peso seco de planta cosechada. Sin embargo, en el año 2011 han aumentado los rendimientos de aceite esencial en todas las parcelas en relación a la campaña 2010. Concretamente, de un rendimiento medio y desviación estándar para todas las microparcels de  $0,60 \pm 0,22$  (%) en la campaña 2010, se obtiene el valor de  $1,12 \pm 0,36$  (%) en la campaña de 2011.

#### IV.4.3.2. Composición química

La tabla 24 muestra las medias de cada uno de los compuestos evaluados conforme al tratamiento de abonado nitrogenado. En este caso, se han calculado los valores medios de las dos campañas.

Tabla 24.- Porcentajes relativos de los principales compuestos volátiles extraídos de *S. lavandulifolia* en relación a la dosis de fertilización nitrogenada aplicada al cultivo.

Compuesto	I.K.	Dosis de fertilización nitrogenada (sulfato amónico)			
		Testigo	20 U.F/ha	45 U.F/ha	65 U.F/ha
$\alpha$ -pineno	943	7,9 $\pm$ 1,5	11,9 $\pm$ 3,8	10,9 $\pm$ 5,0	10,0 $\pm$ 3,5
canfeno	962	2,3 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,6
sabineno	981	1,7 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,8
$\beta$ -pineno + mirceno	991	14,1 $\pm$ 2,0	13,2 $\pm$ 1,8	13,1 $\pm$ 1,2	12,5 $\pm$ 2,9
<i>p</i> -cimeno	1033	0,8 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1
<b>limoneno</b>	1038	4,7 $\pm$ 0,4 a	3,4 $\pm$ 0,9 b	4,0 $\pm$ 0,5 ab	4,2 $\pm$ 0,4 a
<b>1,8-Cineol</b>	1044	35,9 $\pm$ 4,0 a	24,1 $\pm$ 5,1 b	31,0 $\pm$ 6,3 ab	26,4 $\pm$ 11,5 b
$\gamma$ -terpineno	1066	1,9 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,4
alcanfor	1165	5,6 $\pm$ 1,5	5,7 $\pm$ 2,1	6,0 $\pm$ 1,9	5,9 $\pm$ 1,9
<b>borneol</b>	1187	1,7 $\pm$ 0,5 b	3,3 $\pm$ 1,3 a	1,5 $\pm$ 0,8 b	2,0 $\pm$ 0,4 b
<i>trans</i> -cariofileno	1441	3,7 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 1,9	4,6 $\pm$ 1,7	5,1 $\pm$ 2,0
aromadendreno	1477	1,9 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 1,2
biciclogermacreno	1514	0,8 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,9	0,7 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,5
<b>espatulenol</b>	1600	0,8 $\pm$ 0,5 b	2,0 $\pm$ 1,1 a	1,2 $\pm$ 0,8 ab	1,3 $\pm$ 0,5 ab
óxido de cariofileno	1604	1,3 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 1,4
viridiflorol	1621	3,8 $\pm$ 2,5	6,1 $\pm$ 6,1	4,6 $\pm$ 5,0	6,4 $\pm$ 5,7
Total representado %		88,8	88,2	89,1	86,1
Total identificado %		95,4	94,7	94,0	95,2
Monoterpenos hidrocarbonados		31,48	33,8	32,7	31,5
Monoterpenos oxigenados		45,1	36,0	41,4	36,7
Sesquiterpenos hidrocarbonados		6,3	7,9	7,6	8,0
Sesquiterpenos oxigenados		5,9	10,6	7,4	9,9

U.F/ha: Unidades de fertilización por hectárea. Datos representados por la media de las campañas 2010 y 2011 en sus tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. En **negrita** compuestos con diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Diferentes letras representan diferencias significativas en test LSD.

En la mayoría de los compuestos no se observan diferencias significativas en los porcentajes relativos en relación a la aplicación de nitrógeno al suelo. En los casos en los que existen diferencias significativas, como en los compuestos limoneno, 1,8-cineol, borneol y espatulenol, éstas no guardan relación aparente con la cantidad de nitrato amónico suministrado al suelo ni se pueden establecer correlaciones entre el factor y las proporciones relativas de estos compuestos en los aceites esenciales.

#### IV.4.4. Discusión

La aplicación de crecientes dosis de nitrato amónico como fertilizante nitrogenado parece no tener efectos sobre el rendimiento en aceite esencial en *S. lavandulifolia*. Ciertos estudios muestran cómo la aplicación continuada de dosis de nitrógeno hace decrecer la biosíntesis de aceite esencial en otros géneros de la familia *Lamiaceae*, como en el tomillo vulgar, *Thymus vulgaris* L. (Baranauskiene *et al.*, 2003), o en el romero, *Rosmarinus officinalis* L. (Boyle *et al.*, 1991). La fertilización del suelo, en cuanto al aporte de nitrógeno, afecta principalmente al desarrollo de los órganos vegetales y a la formación de las semillas (Dordas & Sioulas, 2008). Los resultados obtenidos por diversos autores para otras especies de interés agrícola son un ejemplo de la variabilidad de resultados que se pueden encontrar en relación al aporte de fertilizantes minerales al suelo. Así, Patel *et al.* (2003) y Ehsanipour *et al.* (2012) en cultivo de hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill.), muestran aumentos de rendimientos en aceite esencial tanto en peso seco como en kg ha<sup>-1</sup>, mientras que Chatzopoulou *et al.* (2006) no relacionan la aplicación de nitrógeno con aumento alguno en los rendimientos. Los resultados observados de aumento de la producción de aceite esencial mediante la aplicación de abonados se deben, principalmente, al aumento de la biomasa vegetal que hace aumentar a su vez los rendimientos en kg de esencia producidos por hectárea de cultivo. Debe tenerse en cuenta que el contraste entre los resultados que se pueden encontrar en la bibliografía, probablemente, esté ocasionado por la influencia de diferentes factores, como son la variabilidad genética del material vegetal utilizado, las condiciones climáticas durante el desarrollo de los experimentos, los diferentes manejos de los cultivos e incluso los métodos extractivos, analíticos y de conservación de los aceites esenciales.

Conforme a nuestros resultados, las diferencias observadas se deben únicamente a las distintas condiciones climáticas que se produjeron en los dos años en que se

repitió el experimento. En el año 2011, se obtuvo un aumento significativo en el rendimiento en aceite esencial producido en todas las microparcels que fueron estudiadas (tabla 23), llegando a un rendimiento medio de 1,12%, mientras que en la campaña anterior, éste había sido de sólo un 0,6%. Esto confirma los resultados descritos con anterioridad en el **Estudio IV.2.**, en los que se ponía de manifiesto que la producción de aceite esencial por parte de esta especie se ve influenciada de manera notable por los factores climáticos en cada campaña, en especial las precipitaciones. Como también se puede apreciar en la tabla 23, dentro de microparcels de cultivo con el mismo tratamiento experimental (repeticiones) existe una gran variabilidad conforme a la producción de aceite esencial. Esto es debido a que este material vegetal proviene de material reproducido cuyo origen son poblaciones naturales, es decir, sin ningún tipo de selección y homogeneidad.

En el ANEXO III (datos climatológicos) y las figuras 19 y 20 del **Estudio IV.2.**, se muestra como en el año 2011 se produjo un descenso en las precipitaciones y un aumento general de las temperaturas medias. Este hecho trajo consigo, entre otros efectos, un descenso notable en la humedad del suelo (figura 19). En el citado estudio se describen los efectos del estrés hídrico en el aumento del rendimiento en la producción de aceite esencial en *S. lavandulifolia*. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo descrito para los genotipos de trabajo en el citado estudio, los cuales, también se desarrollaron en los campos de ensayo y experimentación con PAM del C.I.A de Albaladejito, aunque en parcelas separadas. En ambos casos, bajo las mismas condiciones climáticas y edafológicas, en el año 2011 se produce un aumento significativo del rendimiento en aceite esencial.

En cuanto a la composición química, en primer lugar, hay que destacar la heterogeneidad existente entre el material vegetal utilizado para este trabajo. En la figura 22 se muestra la gran variabilidad dentro de las microparcels en cuanto a los porcentajes relativos de los principales compuestos que forman parte del aceite esencial, es decir, las distintas repeticiones del experimento han dado lugar a una extraordinaria variación y, por lo tanto, una baja repetibilidad y representatividad de los distintos tratamientos. Este hecho trae como consecuencia que las diferencias entre las plantas individuales que forman parte del cultivo sean, en este caso, notables y puedan enmascarar un posible efecto o influencia del abonado nitrogenado sobre la calidad del aceite esencial. Existen numerosos ejemplos que describen las poblaciones naturales de ésta y otras especies de plantas aromáticas caracterizando su polimorfismos en cuanto a

la composición química de los aceites esenciales y otros compuestos derivados del metabolismo secundario (Curado *et al.*, 2006; Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Barra, 2009; Franz & Novak, 2010; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010). En el **Estudio IV.1.** se pone de manifiesto la diversidad intrapoblacional de esta especie en cuanto a la composición química de los aceites esenciales. Todo cultivo que provenga de poblaciones naturales, ya sea mediante la reproducción por semillas o mediante reproducción vegetativa por estaquillado de esquejes, reflejará dicha variabilidad, dando lugar a un producto final como aceite esencial poco homogéneo e impredecible en cuanto a su calidad y productividad.

Estudios realizados con especies que preferentemente viven en suelos calcáreos, como son *Cistus albidus* y *Rosmarinus officinalis*, muestran que el incremento en el contenido de ciertos derivados terpénicos en las hojas de ejemplares desarrollados en suelos silíceos no es atribuido a diferencias edafológicas o nutricionales, sino al mayor estrés al que estas plantas están sometidas en relación a las desarrolladas en ambientes edáficos más óptimos (Ormeño *et al.*, 2008). El estrés ocasionado en suelos silíceos en especies de suelos calcáreos probablemente es debido a la acidez del suelo (Ormeño *et al.*, 2008). La interacción de las plantas con el ambiente se ve favorecida con la biosíntesis de numerosos compuestos metabólicos secundarios que, generalmente, tienen una función de defensa y detoxificación (Wink, 2003). Un aumento en su producción mediado por estrés puede proporcionar una ventaja funcional. Esto puede explicar la estrategia de aumentar la biosíntesis en especies que viven en suelos que no se ajustan a su óptimo biológico.

La aplicación de diversas dosis de abonado nitrogenado durante dos campañas no ha tenido influencia aparente sobre la composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* (tabla 24). En la mayoría de los compuestos representados en esta tabla no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Únicamente cabe destacar, por ser el compuesto mayoritario, el caso del 1,8-cineol, donde los mayores porcentajes relativos se dan en el tratamiento control. Otros trabajos con diversas especies han encontrado que no existe influencia de los aportes nutritivos al suelo o de las condiciones edáficas sobre la composición química de los aceites esenciales (Azizi *et al.*, 2009; Said-Al Ahl *et al.*, 2009). Estos resultados muestran que el efecto en la composición química de algunos factores exógenos como, en este caso, el nitrógeno del suelo, puede ser cuestionado. En todo caso, estos efectos encontrados pueden ser en gran parte dependientes del material vegetal con que se trabaje, o dicho



de otro modo, de factores genéticos, además de otros factores que pueden influir a la vez en el metabolismo secundario de las plantas. Por lo tanto, para evaluar de manera correcta la influencia de algún factor abiótico, se debe trabajar con material vegetal homogéneo o, si no es el caso, éste debe estar previamente caracterizado.

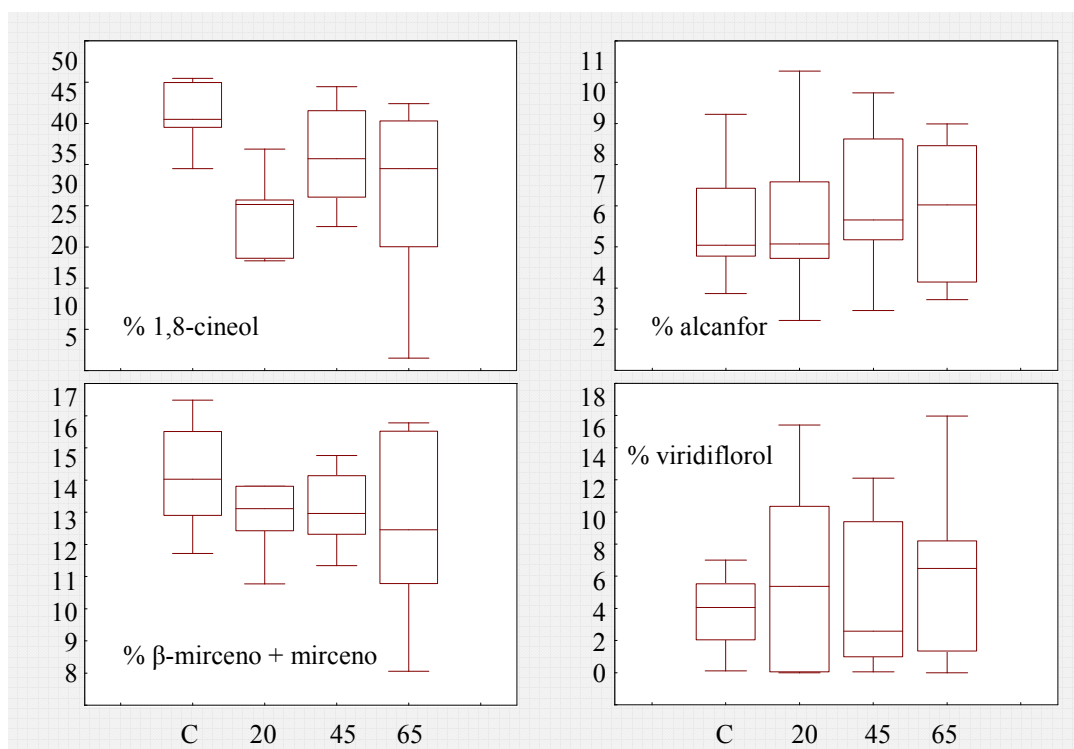


Figura 22.-Diagrama de las medianas de los distintos tratamientos de abono nitrogenado en algunos de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *S. lavandulifolia*. Las líneas horizontales representan a las medianas del porcentaje relativo de cada compuesto en el aceite esencial y las cajas representan los percentiles 25-75%.

## IV.5 VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE *S. lavandulifolia* Vahl. INDUCIDA POR ESTRÉS DEBIDO A ALTAS TEMPERATURAS

### IV.5.1. Introducción

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son compuestos emitidos a la atmósfera a través de fuentes naturales en los ecosistemas terrestres o en el mar (Chappell, 2008), teniendo la mayoría de ellos origen biológico. Se estima que alrededor del 36% del carbono asimilado por las plantas es liberado de nuevo a la atmósfera en forma de COVs (Kesselmeier *et al.*, 2002). Éstos son liberados a la atmósfera a través de las hojas, flores y frutos, y al suelo, a través de las raíces. El isopreno (hemiterpeno con estructura de 5 carbonos) se libera directamente a la atmósfera. Sin embargo, monoterpenos y sesquiterpenos pueden almacenarse en estructuras especializadas hasta su volatilización. Las funciones primarias de estos compuestos son las de defensa frente a patógenos o herbívoros, atracción de polinizadores o dispersantes de las semillas y como señales de comunicación planta-planta (Dudareva & Pichersky, 2008). El isopreno, los monoterpenos y los sesquiterpenos pertenecen a la gran familia de compuestos isoprenoides. Muchos isoprenoides poseen funciones bioquímicas y fisiológicas esenciales para la supervivencia de todas las especies vegetales. Por ejemplo, el ácido abscísico o el ácido giberélico son hormonas isoprenoides de 15 y 20 átomos de carbono, respectivamente. Sin embargo, el isopreno, los monoterpenos y los sesquiterpenos son compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles (COVs) que representan una pequeña parte de los derivados isoprenoides que producen las plantas (Owen & Peñuelas, 2005)

Mientras que el aroma de las flores parece estar ontogenéticamente programado, la cantidad y calidad de estos COVs, que son producidos y liberados por las diferentes partes vegetativas de las plantas puede variar significativamente bajo situaciones de estrés (Heil, 2008). En otras palabras, generalmente las interacciones entre las plantas y el medio ambiente producen una gran diversidad de compuestos derivados del metabolismo secundario. Estas situaciones de estrés pueden estar causadas por patógenos o herbívoros, por un daño tisular o por respuesta a factores abióticos. En este último caso, la biosíntesis de COVs se produce en respuesta a cambios en la intensidad de luz, en la temperatura o en la disponibilidad de agua (Holzinger *et al.*,

2000; Teuber *et al.*, 2008). La respuesta en la biosíntesis y emisión a la atmósfera de estos compuestos puede estar condicionada por cambios de temperatura y, en definitiva, cambios en la volatilidad y en los rangos de difusión de compuestos concretos (Niinemets *et al.*, 2004). Además, ciertos COVs, como el isopreno, tienen la propiedad de estabilizar las membranas de los tilacoides y ejercer en ellas un efecto antioxidante, lo cual incrementa la tolerancia de la planta ante el estrés ambiental (Maffei, 2010). Por otro lado, los monoterpenos de bajo peso molecular que son emitidos a la atmósfera pueden proteger a las plantas contra las altas temperaturas, reemplazando a los procesos de fotorrespiración como mecanismo de protección fotosintética (Peñuelas & Llusiá, 2002). La composición química de los COVs sintetizados por factores bióticos como la herbivoría, también son altamente dependientes de factores abióticos como la disponibilidad de ciertos nutrientes en el suelo, como el nitrógeno o el fósforo, el pH (Schmelz *et al.*, 2003) o la disponibilidad de agua (Owen & Peñuelas, 2005). La radiación o las altas temperaturas también pueden afectar a la emisión de COVs y unirse a las deficiencias o al estrés causado por factores edáficos como la salinidad y el pH (Kesselmeier & Staudt, 1999).

En las plantas, el estrés por cambios de temperatura, generalmente induce o aumenta las formas de oxígeno reactivas, además de causar importantes cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en el metabolismo vegetal, que se traducen en daños como la desnaturalización de proteínas o la perturbación de la integridad de las membranas celulares (Levitt, 1980). Muchos de estos cambios alteran las concentraciones de metabolitos secundarios en los tejidos vegetales, pudiendo ser usados, a la postre, como indicadores del daño por estrés ocasionado en las plantas.

De los estudios de la influencia de la temperatura en la composición química de los aceites esenciales, al igual que ocurre con otros factores ambientales, no se deducen resultados homogéneos. Como ejemplo, las altas temperaturas dan como resultado mayores concentraciones de 1,8-cineol en *Mentha piperita* L. (Clark & Menary, 1980). En esta línea, Franz & Novak (2010) revelan que, en especies de orégano (*Origanum* sp.), el compuesto sabineno no se ve influenciado por la temperatura, a diferencia de los compuestos timol y carvacrol. Éstos, a pesar de ser monoterpenos fenólicos muy relacionados químicamente entre sí, reaccionan de manera opuesta con el aumento de la temperatura. Sin embargo, Duriyaprapan *et al.* (1986) no encuentran estas diferencias en *Mentha canadiensis*.

La hipótesis de este estudio es que el estrés por altas temperaturas puede alterar la concentración de metabolitos secundarios en plantas de *Salvia lavandulifolia*. Ciertos estudios demuestran que los patrones fitoquímicos están condicionados en su mayor parte por factores genéticos, y que los cambios debidos a factores climatológicos o ecológicos dan como resultado variaciones que mantienen la identidad de los quimiotipos (Franz *et al.*, 1986; Salamon, 2007). Por este motivo, para este estudio se han empleado dos clones distintos de *S. lavandulifolia* provenientes de poblaciones naturales diferentes, que han sido previamente caracterizados. Con ello, se pretende controlar el efecto de la variabilidad genética en el material vegetal utilizado para el estudio y poder así relativizar los posibles efectos de la temperatura en las concentraciones de COVs. El principal objetivo es conocer la respuesta de esta especie ante cambios de temperatura bajo condiciones ambientales controladas, así como la adaptabilidad de dos genotipos distintos ante estos cambios.

#### **IV.5.2. Material y Métodos**

##### **IV.5.2.1. Material vegetal y diseño experimental**

En este apartado se utilizaron las plantas multiplicadas vegetativamente según lo expuesto en el **Estudio IV.2.** (Apartado IV.2.2.). Una vez desarrollado el sistema radicular de los esquejes, éstos se trasplantaron a macetas. En primer lugar, en cada una de ellas se depositó en la base un drenaje en forma de grava y, posteriormente, se rellenaron hasta tres cuartas partes de su volumen con compost comercial. Todas las macetas tuvieron el mismo tratamiento de preparación y acondicionamiento. Los individuos de trabajo fueron escogidos en base al número de réplicas viables en invernadero y a su nivel de desarrollo y adaptación a las condiciones de crecimiento en maceta. Así, los individuos que mejor adaptación mostraron a esas condiciones, en cuanto a desarrollo y vigor, fueron los provenientes de los genotipos denominados como B1 y D3. Por motivo de la escasa capacidad disponible en las cámaras de cultivo empleadas se seleccionaron únicamente estos dos clones de trabajo para el estudio.

Para los experimentos se utilizaron dos cámaras de cultivo de distinta capacidad. La cámara 1 o cámara control, Modelo AGP/HR con capacidad para 10-15 macetas, y la cámara experimental, Modelo GROW/HR con capacidad para 25-30 macetas, ambas

de la marca Ingeniería Climas. Para realizar los experimentos se definieron las siguientes condiciones de control:

- Temperatura: 24° C (luz) + 14° C (oscuridad)
- Luz: 14 h luz + 10 h oscuridad. Con el 66.6% de iluminación con respecto a la capacidad total de la cámara. La intensidad lumínica medida como radiación PAR fue de 46.12  $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$  (medidos con sonda cuanto-radiométrica).
- Humedad relativa: 60%
- Dosis de riego hasta llegar a la capacidad de campo cada 15 días. Ésta fue calculada en 750 ml.

Los experimentos en las cámaras de cultivo de ambiente controlado se desarrollaron de la siguiente manera:

1- Ambas cámaras, experimental y control se programaron con las condiciones de trabajo arriba descritas. Ejemplares de los dos genotipos seleccionados se depositaron en las dos cámaras. Trascurridos 30 días, se procedió a la recolección del material vegetal y a la extracción de los compuestos orgánicos volátiles mediante el uso de disolventes orgánicos y baño de ultrasonidos.

2- Las macetas depositadas en la cámara control se trasladaron a la cámara experimental. Se mantuvieron con una nueva temperatura de trabajo de 15° C (luz) + 6° C (oscuridad) durante los siguientes 30 días. Mientras tanto en la cámara control se depositaron nuevos ejemplares de ambos genotipos para su aclimatación a estas condiciones. Trascurridos 30 días, se procedió a la recolección del material vegetal y a la extracción de los compuestos volátiles mediante el uso de disolventes orgánicos y ultrasonidos.

Esta secuencia se repitió para cada una de las temperaturas ensayadas con los clones de trabajo según lo detallado en la tabla 25.

Tabla 25.- Secuencia de condiciones en los ensayos de temperatura con los genotipos B1 y D3.

Tiempo	Cámara de cultivo para ambiente controlado	
	Cámara control	Cámara experimental
Mes 1	Condiciones control	Condiciones control
Mes 2	Condiciones control	16°C (luz) + 6°C (oscuridad)
Mes 3	Condiciones control	20°C (luz) + 6°C (oscuridad)
Mes 4	Condiciones control	8°C (luz) + 4°C (oscuridad)
Mes 5	Condiciones control	32°C (luz) + 18°C (oscuridad)

Las condiciones control están descritas en el texto.

#### IV.5.2.2. Extracción de los compuestos volátiles

Para este estudio, a diferencia de los anteriores, no se empleó el método de destilación por hidrodestilación para el aislamiento de los aceites esenciales, sino que se optó por la utilización de disolventes orgánicos para extraer los compuestos orgánicos volátiles de las plantas. Este hecho fue debido a la escasez de material vegetal, el cual fue insuficiente para realizar todas las hidrodestilaciones programadas.

Para la extracción mediante disolventes orgánicos, de cada una de las muestras se utilizó 0,3g de material vegetal seco, el cual fue troceado en pequeñas porciones. Este material se depositó en un vial, al cual se añadieron 1,5ml del disolvente orgánico (diclorometano). Este vial se llevó a un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se filtró toda la muestra con lana de vidrio, y la extracción resultante se guardó en tubos “eppendorf” adecuadamente etiquetados. Finalizada la extracción, el tratamiento de etiquetado y almacenamiento hasta el análisis químico coincide con lo descrito para el resto de estudios.

#### IV.5.2.3. Análisis de la composición química

El análisis de la composición química de los COVs se llevó a cabo conforme a la metodología descrita en el apartado de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES (III.2).

#### IV.5.3. Resultados

Para evaluar la influencia que tiene la temperatura sobre la expresión de ciertos compuestos volátiles, se mantuvieron en cámara de cultivo en condiciones controladas dos de los clones de trabajo, B1 y D3. En la tabla 26 se presentan los porcentajes relativos medios de los compuestos evaluados conforme a incrementos en la temperatura de mantenimiento. Los rangos moderados de temperatura parecen no afectar a la composición química de los compuestos volátiles. Durante el mantenimiento con temperaturas que van desde los 8°C a los 24°C ambos clones mantienen las características en cuanto composición química que les son propias y que han sido descritas en los **Estudios** anteriores. No obstante, en el momento que la temperatura de mantenimiento sube hasta los 32 °C se produce un notable cambio en la composición química. Los compuestos de alto peso molecular, como los sesquiterpenos, aumentan en gran medida su proporción entre los volátiles, en detrimento de los monoterpenos (figura 23). Especialmente notable es el descenso de la proporción relativa del compuesto mayoritario (1,8-cineol) en el genotipo D3, cuyo valor llega a suponer alrededor de la quinta parte de lo detectado para temperaturas más bajas. Este descenso es menos acusado en B1. Otros compuestos como la suma de  $\beta$ -pineno + mirceno también experimentan un descenso en estas circunstancias ambientales. Por el contrario, sesquiterpenos como el *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno y viridiflorol ven aumentada su proporción relativa a temperaturas altas. Es de destacar, que igual que en experimentos anteriores, los dos clones o genotipos de trabajo mantienen bajo todas las condiciones las características que les hacen distinguibles. El clon D3 no sintetiza el compuesto viridiflorol en caso alguno, como ocurrió en las muestras recogidas en su hábitat natural y los ensayos en ambiente homogéneo (**Estudios IV.1. y IV.2.**). Por el contrario, el clon B1 lo expresa en todas las muestras analizadas a lo largo de los rangos de temperatura a los que fue sometido, especialmente cuando esta temperatura de mantenimiento en la cámara de cultivo es

elevada. Cabe destacar también el papel creciente que juegan los diterpenos cuando el estrés por altas temperaturas es elevado. El clon D3 expresa en un porcentaje de más del 10% el diterpeno manool, cuando no había sido detectado en ningún otro momento de los experimentos, ni en caso alguno en el clon B1. Este diterpeno había sido detectado hasta ahora únicamente en los clones C3 y D3 (ANEXO I, Apartado VII.1.2). En ambos genotipos, cuando fue detectado, sólo lo fue en proporciones traza, sin suponer más del 1% en caso alguno.

Tabla 26.- Porcentajes relativos medios de los compuestos volátiles mayoritarios de *S. lavandulifolia* en relación a la temperatura de mantenimiento en cámara de cultivo.

Compuestos	Temperatura °C									
	8°C		16°C		20°C		24°C		32°C	
	B1	D3	B1	D3	B1	D3	B1	D3	B1	D3
$\alpha$ -pineno	7,4	3,2	6,1	3,0	8,4	4,6	6,7	2,9	4,1	2,8
canfeno	2,0	1,4	1,4	0,6	1,7	0,6	1,3	0,2	1,1	0,2
sabineno	1,9	3,3	2,6	3,7	2,4	1,9	2,3	3,6	1,7	0,6
$\beta$ -pineno + mirceno	13,8	12,2	11,7	11,5	15,8	16,0	12,3	13,6	9,3	6,5
p-cimeno	1,2	0,8	0,3	0,3	-	0,9	0,3	0,2	0,6	0,8
limoneno	3,4	4,5	2,0	6,1	-	3,8	1,9	4,8	2,5	2,5
1,8-cineol	35,8	49,4	47,5	54,3	37,3	49,8	39,2	55,0	29,1	11,2
cis sabineno hidrato	0,7	1,0	1,1	0,8	0,2	1,0	0,9	0,8	0,7	0,5
alcanfor	8,6	7,1	3,7	2,8	4,4	2,8	5,4	0,5	5,4	2,2
borneol	3,1	2,2	1,9	0,4	2,1	0,5	1,7	0,1	4,1	0,6
$\alpha$ -terpineol	0,4	0,4	1,6	0,3	0,9	2,6	1,0	0,3	0,6	0,2
<i>trans</i> -cariofileno	1,5	3,4	2,2	3,0	2,6	2,9	2,3	4,8	2,4	8,6
$\alpha$ -zingibereno	1,2	-	1,6	1,2	2,2	0,3	2,1	1,9	2,5	-
$\beta$ -bisaboleno	2,3	-	2,3	-	3,4	0,9	2,7	-	5,1	-
óxido de cariofileno	1,0	3,0	0,8	1,9	0,4	0,7	1,8	1,7	2,3	12,2
viridiflorol	3,5	-	4,0	-	4,9	-	3,4	-	9,4	-
manool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,3
Monoterpenos	84,6	90,4	84,6	89,2	82,7	91,5	83,3	87,1	70,1	36,8
Sesquiterpenos	13,9	9,2	13,3	9,6	16,6	8,1	14,6	11,8	29,0	43,5
Diterpenos	1,3	0,2	0,1	0,6	0,5	0,3	1,23	0,5	0,6	19,6



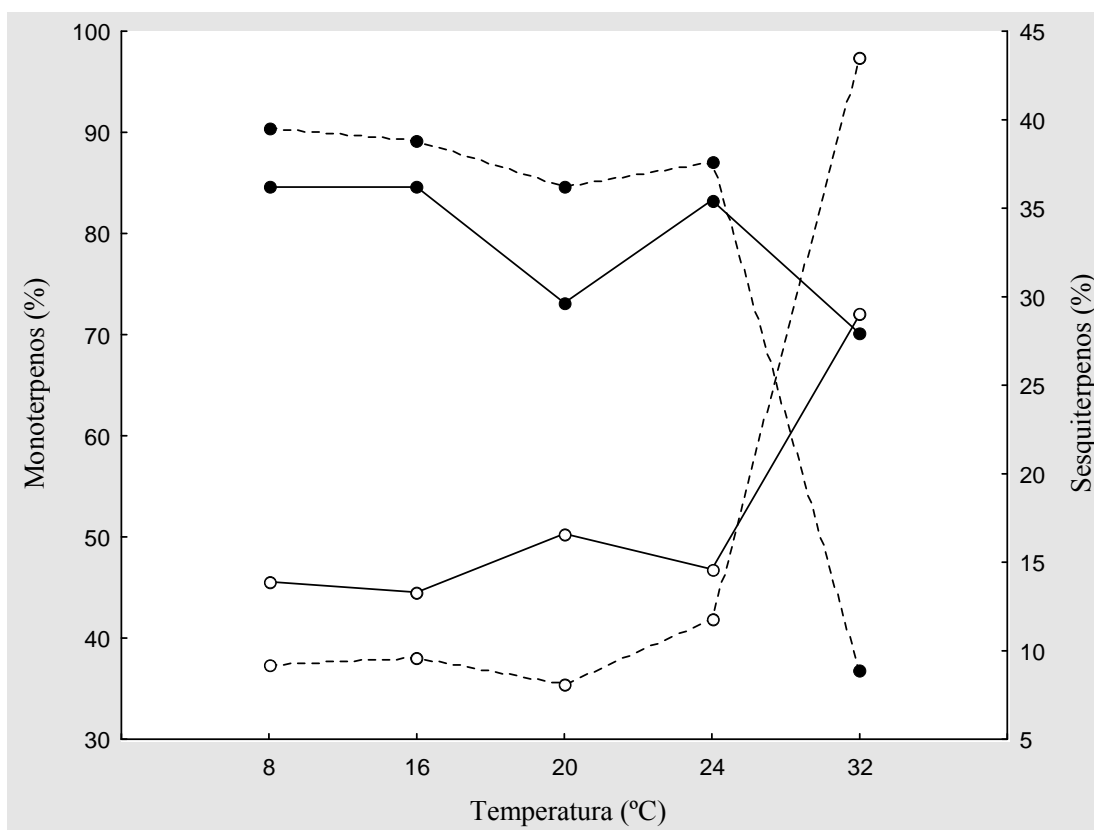


Figura 23.- Porcentajes relativos de monoterpenos (●) y sesquiterpenos (○) en *S. lavandulifolia* en relación con la temperatura de mantenimiento en ambiente controlado. La línea continua representa al genotipo B1 y la línea discontinua al genotipo D3.

#### IV.5.4. Discusión

Uno de los factores ambientales que más afectan a los procesos fisiológicos de las plantas, especialmente a la fotosíntesis y al crecimiento, es la temperatura. Las situaciones de estrés conducen a cambios fisiológicos en las plantas, los cuales promueven a su vez la biosíntesis de metabolitos secundarios, probablemente, para restaurar los mecanismos de defensa (Zobayed *et al.*, 2005). Entre algunos de los mecanismos de defensa celular frente al estrés oxidativo, han sido descritos los efectos antioxidantes de algunos diterpenos como el ácido carnósico y sus derivados en otras especies de *Lamiaceae*, tanto tolerantes al estrés hídrico, como *Rosmarinus officinalis*, como susceptibles a dicho estrés, como *Salvia officinalis* (Munné-Bosch *et al.*, 2001).

En estos casos, se ha descrito que los productos de la oxidación del ácido carnósico (como el rosmanol y el isorosmanol) se incrementan en plantas inducidas a estrés hídrico de *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch & Alegre, 2000), y que esta actividad antioxidante del ácido carnósico se localiza en los cloroplastos. Además, otros diterpenos poseen demostradas funciones fotoprotectoras, antioxidantes y hormonales (Owen & Peñuelas, 2005), como los carotenoides que se acumulan en los tejidos verdes ante situaciones de estrés (Bouvier *et al.*, 1998).

La hipótesis oportunista sugiere que las condiciones de estrés que afectan a la síntesis de los isoprenoides de mayor peso molecular podrían afectar a la producción y emisión de los isoprenoides volátiles o semivolátiles. La demanda de los precursores de los derivados isoprenoides como el IPP (Isopentenil pirofosfato) y el DMAPP (dimetilalil pirofosfato) en los tejidos vegetales, está condicionado por multitud de factores y, en cada momento, la planta puede necesitar sintetizar un amplio rango de compuestos isoprenoides para el crecimiento, reproducción, reparación o protección frente a un agente causante de estrés. Cualquier demanda de los denominados derivados isoprenoides “esenciales” (carotenoides, ácido abscísico, ácido giberélico, etc.) bajo condiciones de estrés, puede cambiar la magnitud de la emisión de COVs de acuerdo con esta hipótesis oportunista (Owen & Peñuelas, 2005).

Las plantas de *Salvia lavandulifolia* desencadenaron una respuesta de termoprotección bajo unas condiciones ambientales de 32°C. Los dos genotipos se han protegido del sobrecalentamiento emitiendo COVs de bajo peso molecular. Ambos genotipos disminuyeron los porcentajes relativos de monoterpenos totales y aumentaron el de sesquiterpenos ante esta situación de estrés por temperaturas. Sin embargo, en el genotipo D3 el descenso del porcentaje relativo de monoterpenos es más acusado (figura 23), lo cual hace indicar que en este caso ha existido una mayor o más eficaz volatilización de estos compuestos. En este genotipo, los monoterpenos pasan de representar más del 87% detectado con temperaturas de mantenimiento de hasta 24° C, a representar algo más del 36% a una temperatura controlada de 32° C. Además, únicamente el genotipo D3 dispara los niveles de manool (derivado oxidado) cuando la planta se encuentra en niveles altos de estrés oxidativo debido a las altas temperaturas. Como se ha puesto de manifiesto en el **Estudio IV.2.**, en el que se hacía un seguimiento fenológico de los aceites esenciales de distintos genotipos de *S. lavandulifolia*, se han detectado concentraciones traza de manool en el genotipo D3 en algunos estadios a lo

largo de su ciclo vegetativo. Sin embargo, en ningún caso se detectó la presencia de este diterpeno en el genotipo B1 (ANEXO II, Apartado VII.2.).

Ambos genotipos responden cualitativamente de la misma manera en lo referente a los monoterpenos y sesquiterpenos. Aunque esto es así, resultan llamativas las diferencias cuantitativas en cuanto a su respuesta ante el estrés. El genotipo D3 parece estar mejor adaptado o responder de manera más eficaz, ya que aumenta de manera significativa los niveles de manool, además de volatilizar mayores proporciones de monoterpenos que el genotipo B1. Ante la importante presencia de este compuesto altamente oxidado, podría suponerse que este hecho le ha ocasionado una disminución del estrés oxidativo y, por lo tanto, un aumento en la eficacia fotosintética si se compara con la respuesta del genotipo B1. Sin embargo, debido a que se han evaluado porcentajes relativos y no concentraciones absolutas, no es posible saber si estos cambios han afectado a la eficacia biosintética de los precursores de los derivados isoprenoides como el IPP (Isopentenil pirofosfato) y el DMAPP (dimetilalil pirofosfato).

Las situaciones ambientales que producen un alto índice de estrés debido a factores abióticos conducen en las plantas, normalmente, a la aparición de especies de oxígeno reactivas, incluyendo aniones superóxido ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilo (OH), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), entre otras (Munné-Bosch & Peñuelas, 2003). Éstas pueden reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos causando un daño oxidativo en las células. La producción de estos oxidantes va en paralelo con la severidad del estrés, lo que conduce a una peroxidación de las membranas lipídicas y a la degradación estructural y funcional de los ácidos nucleicos y las proteínas. Algunos orgánulos, como los cloroplastos y las mitocondrias, son las primeras dianas de estas especies de oxígeno reactivas producidas bajo estrés hídrico. En las plantas, el estrés inducido por altas temperaturas generalmente aumenta la producción de las citadas moléculas reactivas de oxígeno junto con enzimas como la superóxido dismutasa, las catalasas, peroxidasas y algunos compuestos con capacidad antioxidante. Un estrés por altas temperaturas puede ocasionar en las plantas diversos cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en su metabolismo, como la degradación de proteínas o perturbaciones en la integridad de las membranas celulares (Levitt, 1980). La concentración, en general, de metabolitos secundarios se ve incrementada bajo situaciones de estrés por temperatura en condiciones ambientales controladas en la Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) (Zobayed *et al.*, 2005).

La emisión a la atmósfera de COVs se incrementa con la temperatura hasta un máximo en el cual la degradación enzimática afecta a la biosíntesis y a los patrones de emisión. La emisión a la atmósfera depende, principalmente, del gradiente de presión de vapor existente entre los tricomas glandulares, donde existe una gran concentración de estos compuestos, y la porción de aire alrededor de éstos (Owen & Peñuelas, 2005). La temperatura incrementa esta emisión exponencialmente, debido al aumento de la actividad enzimática por el aumento de la presión de vapor de los COVs y el descenso de la resistencia a la difusión (Guenther *et al.*, 1994). Existen muchos casos de una rápida e inducida producción de isoprenoides no esenciales (isopreno, monoterpenos y sesquiterpenos) en respuesta ante situaciones de estrés. La emisión de monoterpenos desde sus lugares de almacenamiento (en este caso los tricomas glandulares) parece tener un papel importante en este sentido.

Estos resultados proporcionan la primera evidencia de que la temperatura puede ser un factor a tener en cuenta en la producción de metabolitos secundarios en la salvia española, y que su control puede permitir una aplicación específica o ser de utilidad a la hora del manejo y gestión de su producción.

## **IV.6 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *S. lavandulifolia* Vahl.**

### **IV.6.1. Introducción**

Recientemente, los aceites esenciales y los extractos de plantas han atraído el interés científico debido a sus propiedades como antioxidantes naturales y a los potenciales usos derivados de sus actividades biológicas (Hussain *et al.*, 2008). En la naturaleza, los aceites esenciales juegan un papel importante como agentes protectores de las plantas frente a bacterias, virus, hongos, insectos e incluso herbívoros, además de atraer a insectos a favor de la dispersión del polen o las semillas, o de repeler a los que tengan efectos indeseables (Bakkali *et al.*, 2008). Los aceites esenciales pueden ser sintetizados por cualquier parte de la planta (hojas, tallos, raíces, flores y frutos). En relación a los compuestos orgánicos volátiles y los aceites esenciales, uno de los principales debates concierne a su función biológica en los tejidos vegetales. Se encuentra muy generalizada la afirmación de que estos compuestos son sintetizados por las plantas para la atracción de polinizadores (Reinhard *et al.*, 2004; Pichersky & Gershenzon, 2002) aunque en realidad, la producción por parte de las flores de estos compuestos como atrayentes altamente específicos para la polinización ha sido bien documentada solo recientemente (Maffei, 2010). Los aceites esenciales son, por tanto, una gran fuente de compuestos biológicamente activos.

A lo largo de la historia, los aceites esenciales han sido utilizados en referencia a su capacidad antimicrobiana por parte de la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas desde mucho antes del conocimiento sobre la existencia de los microorganismos (Rios & Recio, 2005). Lavandas, cítricos, romeros, albahacas, eucaliptos o anises, han sido tradicionalmente usados con propósitos curativos en muchas partes del mundo (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Se han llevado a cabo, en las últimas décadas, numerosas investigaciones con el objetivo principal de relacionar la composición química de los aceites esenciales con su actividad biológica y su posible aplicación como productos naturales. En este sentido, han sido testadas las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales de una gran variedad de especies vegetales (Pauli & Schilcher, 2010). A la gran variabilidad química que presentan, se encuentra asociada una gran multifuncionalidad como consecuencia de su capacidad para interaccionar con receptores específicos de múltiples dianas biológicas. En este sentido,

muchos de los aceites esenciales destacan por ser eficientes insecticidas frente a una amplia gama de insectos (Hummelbrunner & Isman, 2001; Pavela, 2005; Thripathi *et al.*, 2009; Isman *et al.*, 2011), además de poseer actividad antimicrobiana (Auria *et al.*, 2005; Bozin *et al.*, 2007) y fitotóxica (Argyropoulus *et al.*, 2008).

De entre las especies con demostrada capacidad antibacteriana, un grupo importante lo forman las que pertenecen a la familia *Lamiaceae*. Algunas de estas especies son el orégano (*Origanum vulgare*), los tomillos (*Thymus* sp.), el romero (*Rosmarinus officinalis*), la menta (*Mentha piperita*) o las salvias (*Salvia* sp.) (Kalemba & Kunicka, 2003; Pauli & Schilcher, 2010). Las especies del género *Salvia* han sido utilizadas tradicionalmente para tratar diversas enfermedades bacterianas. Sin embargo, la composición química de los aceites esenciales de las distintas especies es extraordinariamente variable cualitativa y cuantitativamente. Aunque es altamente reconocida la capacidad de muchas especies del género *Salvia* para sintetizar compuestos de gran interés en el ámbito farmacéutico o cosmético, la gran mayoría de los estudios se han restringido a la especie predominante en el mercado, *S. officinalis*. Sus actividades antibacterianas contra diversos microorganismos han sido descritas desde hace décadas, atribuyéndose dicha actividad a la presencia de los compuestos mayoritarios de sus aceites esenciales como 1,8-cineol,  $\alpha$ - y  $\beta$ -tuyona, alcanfor o borneol (Bakkali *et al.*, 2008). En este contexto, el principal objetivo de este estudio es valorar la capacidad antibacteriana que tienen los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* extraídos en distintas épocas del año frente a una serie de especies bacterianas de interés. Además, estos resultados permitirán la deducción de qué componentes pueden contribuir a la actividad antimicrobiana, de acuerdo con la caracterización química de los distintos aceites esenciales. Estos ensayos proporcionarán nueva información útil para evaluar tiempos óptimos de recolección de material vegetal en base a los requerimientos de calidad por parte de la industria. Las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* provenientes de poblaciones naturales no han sido testadas previamente.

## **IV.6.2. Material y Métodos**

### **IV.6.2.1. Material vegetal**

El material vegetal utilizado para este ensayo provino de las plantas cultivadas en las microparcels descritas para el **Estudio IV.4**. Concretamente, se utilizó el material vegetal de las microparcels control. Estos ensayos se realizaron un año antes del comienzo de los experimentos descritos en el citado estudio. Las plantas, por lo tanto, contaban con 3 años desde su implantación en cultivo. Se enfocó el estudio hacia una variación estacional, por lo tanto, se realizó una cosecha para cada una de las estaciones del año. La recolección de material vegetal consistió en la cosecha de las partes aéreas de las plantas. Así, la recolección de invierno se realizó en el mes de enero, la de primavera en abril, la de verano en julio y la de otoño en octubre de 2009. Cada material vegetal cosechado se trató de forma independiente en cuanto a la destilación y análisis de la composición química de los aceites esenciales. En cada una de las estaciones se calculó el rendimiento en esencia y se analizó su composición química.

### **IV.6.2.2. Extracción y análisis de los aceites esenciales**

Tanto la extracción como los análisis de los aceites esenciales se llevaron a cabo conforme a la metodología descrita en los apartados de MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES (III.1. y III.2., respectivamente).

### **IV.6.2.3. Ensayos antimicrobianos (método de difusión en agar)**

Una vez aislados y almacenados, estos aceites esenciales fueron testados frente a un conjunto de bacterias para medir su actividad antibacteriana como fases en contacto. El método empleado fue el conocido como método de difusión en agar (NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1997). Los microorganismos empleados comprendieron dos especies de bacterias Gram positivas: *Bacillus subtilis* CECT 39 y *Bacillus polymyxa* CECT 155; y cuatro especies de bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* CECT 515, *Enterobacter aerogenes* CECT 684, *Serratia marcescens* CECT 159 y una especie bacteriana del género *Salmonella*.

Todas las cepas bacterianas fueron suministradas por el departamento de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Brevemente, y en primer lugar, las bacterias fueron cultivadas en medio TSB (medio de digerido de soja y caseína) hasta conseguir una concentración estándar establecida en la escala Mc Farland como 0,5. A partir de esta concentración de partida, se realizaron todos los experimentos de inhibición por el método de difusión en agar. Las bacterias crecieron durante 24 horas a 37°C en Placas Petri donde se depositó en el centro un disco de papel (Whatman N°1, 9 mm de diámetro) impregnado con 1mL del aceite esencial puro. Los diámetros de inhibición fueron medidos en mm con pie de rey (los 9 mm de diámetro del disco están incluidos en cada una de las mediciones). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. En cada uno de los test se incluyó un control positivo y un control negativo. El control positivo consistió en el empleo de diluciones de antibióticos comerciales para la impregnación de los discos y, el control negativo, en discos sin impregnación alguna. Para *Escherichia coli* se empleó Ampicilina con una carga del disco de 10mg. Para las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus polymyxa* la carga del disco fue de 2,5mg de Tetraciclina. Para las especies *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella* sp. se empleó como control positivo Kanamicina con una carga en los discos de 5mg.

#### **IV.6.2.4. Análisis de datos**

La significación en la variación de los distintos halos de inhibición entre las distintas épocas de recolección del material vegetal y entre las especies de bacterias se evaluó utilizando el análisis de la varianza (ANOVA). Posteriormente, se utilizó el test de comparaciones múltiples (LSD) entre los distintos tratamientos sobre los que rechazamos la igualdad común de todos ellos, con la idea de formar grupos de tratamientos equivalentes ( $p < 0,05$ ). Previo a los análisis, los datos fueron examinados conforme a su ajuste a normalidad y homocedasticidad de los residuos.

#### **IV.6.3. Resultados**

Del material vegetal recolectado para estos ensayos se extrajeron los aceites esenciales para evaluar su actividad antibacteriana. Además, como en el resto de los estudios, se calcularon los rendimientos y se analizó la composición química.



Al igual que ocurría en los casos anteriormente descritos, la mayor producción de aceite esencial se produjo durante la recolección de otoño. Así, los rendimientos medios obtenidos en este caso fueron de 1,4% en el mes de febrero, 0,9% en el mes de mayo, 1,7% en el mes de julio y de 2,7% durante el mes de noviembre.

La composición química completa de los aceites esenciales se detalla en la tabla 27. Los principales constituyentes de los aceites esenciales obtenidos fueron 1,8-cineol (21,4-33,8%), seguido de  $\alpha$ -pineno (10,5-17,5%),  $\beta$ -pineno (6,0-17,3%), limoneno (5,6-10,4%), alcanfor (6,1-9,4%) y *trans*-cariofileno (4,0-8,5%). Los monoterpenos representan en todos los casos más del 80% del total identificado.

Los resultados de los halos de inhibición producidos por los aceites esenciales (tabla 28) muestran la capacidad antibacteriana de los mismos. Todas las bacterias han sido susceptibles a los aceites esenciales, y su crecimiento ha sido inhibido en mayor o menor medida. Los análisis estadísticos muestran que únicamente existe una elevada significación en cuanto a la sensibilidad de las diferentes especies bacterianas a los aceites esenciales ( $F=4,74$ ;  $p<0,01$ ). Sin embargo, aún sin detectarse diferencias significativas entre las distintas épocas de recolección conforme al conjunto de microorganismos de trabajo ( $F=2,55$ ;  $p=0,06$ ), cabe destacar que, en todos los casos, las mayores inhibiciones medias se observan en los aceites esenciales recolectados en otoño e invierno. Los resultados obtenidos mediante el método de difusión en agar muestran las mayores inhibiciones en *Bacillus polymyxa* (12,6-20,6 mm). Por otro lado, las menores se observaron frente a *Salmonella* sp. y *Enterobacter aerogenes*, con rangos en los diámetros de inhibición de 10,3-14,3 mm y 11,0-13,0 mm, respectivamente. Además, las bacterias Gram positivas han sido significativamente más sensibles que las Gram negativas ( $F=16,30$ ;  $p<0,01$ ).

Tabla 27.- Seguimiento estacional de la composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia*.

Componentes	K.I	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
triciclono	915	0,3 ± 0,0	-	0,1 ± 0,1	2,2 ± 1,1
α-tuyeno	920	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2
α-pineno	926	11,4±2,3	17,5±3,7	10,5±2,2	12,5±1,9
canfeno	942	5,0 ± 1,0	2,7 ± 0,8	4,8 ± 1,9	5,8 ± 0,8
β-pineno	971	6,0 ± 1,0	14,6 ± 2,6	6,0 ± 2,3	17,3 ± 3,6
mirceno	974	8,1 ± 1,3	4,4 ± 0,9	10,0 ± 1,5	0,1 ± 0,1
δ-3-careno	1005	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
α-terpineno	1008	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
o-cimeno	1013	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
γ-terpineno	1053	2,1 ± 0,3	7,0 ± 1,2	2,5 ± 0,3	2,5 ± 1,3
limoneno	1021	10,1 ± 2,2	5,6 ± 1,3	10,4 ± 2,3	8,9 ± 2,0
1,8 cineol	1024	24,1 ± 4,1	21,4 ± 3,9	33,8 ± 3,5	26,2 ± 2,3
β-(Z)-ocimeno	1030	-	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,1	-
cis-sabineno hidrato	1057	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
alcanfor	1145	7,8 ± 1,2	6,1 ± 0,7	9,0 ± 1,1	9,4 ± 1,3
borneol	1171	4,3 ± 1,3	1,6 ± 0,6	3,2 ± 0,7	3,9 ± 1,2
terpinen-4-ol	1185	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2
α-terpineol	1193	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
acetato de bornilo	1290	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	-
trans-cariofileno	1414	4,0 ± 1,0	8,5 ± 1,7	4,8 ± 1,2	4,3 ± 1,6
aromadendreno	1441	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
β-selineno	1480	4,1 ± 0,6	2,4 ± 0,7	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,5
espatulenol	1570	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	-	0,7 ± 0,2
óxido de cariofileno	1580	1,2 ± 0,7	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0
longiborneol	1587	-	-	-	0,7 ± 0,2
% Total identificado y representado		91,6	96,4	99,5	99,6
Monoterpenos hidrocarbonados		33,8	47,9	34,9	41,4
Monoterpenos oxigenados		47,1	36,2	57,3	49,7
Sesquiterpenos hidrocarbonados		8,2	11,3	6,6	6,1
Sesquiterpenos oxigenados		2,2	0,7	0,1	2,4

Los valores son porcentajes relativos ± desviaciones estándar ; - compuesto no detectado.

Tabla 28.- Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia*.

Microorganismos	Aceites esenciales				Antibióticos
	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	
<i>Escherichia coli</i>	12,3±0,4 b	14,3±0,4 a	14,3±1,2 a	12,6±0,4 ab	14,5±0,3
<i>Bacillus subtilis</i>	16,0±7,5 a	17,0±1,6 a	16,6±2,3 a	17,0±1,6 a	20,6±1,2
<i>Bacillus polymyxa</i>	12,6±4,7 b	20,6±4,9 a	18,3±3,7 a	18,3±2,0 a	28,3±0,7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	11,0±0,0 b	12,6±0,7 a	13,0±0,0 a	11,0±0,1 b	18,3±0,7
<i>Serratia marcescens</i>	12,6±0,4 a	14,6±0,4 a	16,6±0,4 a	18,3±2,0 a	28,6±0,4
<i>Salmonella</i> sp.	10,3±0,4 c	13,0±0,8 a	14,3±0,4 a	11,6±0,4 b	22,6±0,4

El diámetro de inhibición (mm) incluye el diámetro del disco de 9mm. Los valores son media  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones. Valores dentro de las filas seguidos de las mismas letras no muestran diferencias significativas al 95% en un test LSD

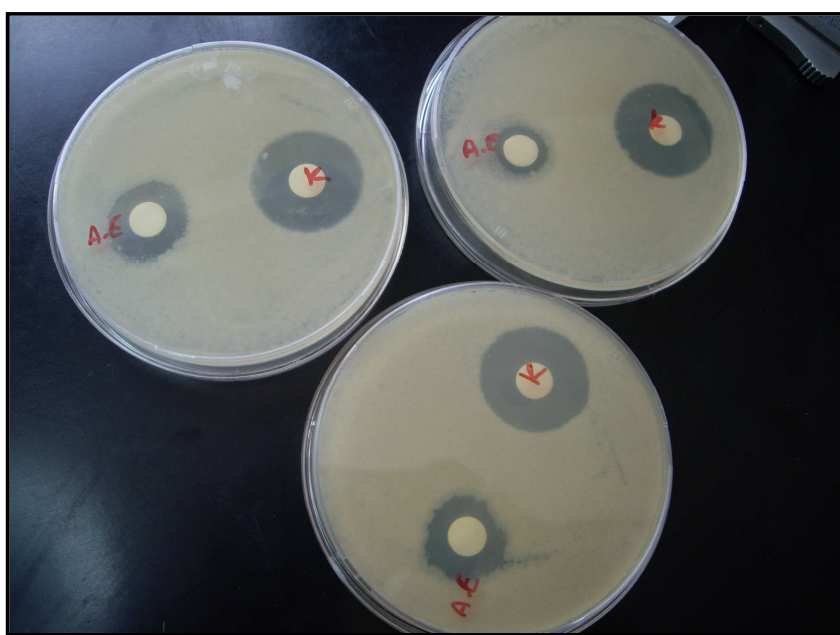


Imagen 9.- Halos de inhibición de los aceites esenciales mediante el empleo del método de difusión en agar.

#### IV.6.4. Discusión

Los aceites esenciales y los extractos vegetales han sido tradicionalmente utilizados con fines terapéuticos y de conservación de los alimentos (Burt, 2004; Lang & Buchbauer, 2011). Los estudios *in vitro* muestran inhibición bacteriana, sin embargo, ésta se produce con una variada efectividad.

En primer lugar, y en relación a los rendimientos encontrados durante este estudio, los datos siguen la tendencia descrita con anterioridad por la cual la producción de aceite esencial en *S. lavandulifolia* aumenta en la época posterior a la formación y maduración de los frutos. Los resultados de rendimiento obtenidos durante el año 2009 son valores aproximados a los que se obtuvieron durante el año 2011. Por lo tanto, los rendimientos son mayores que los obtenidos durante el año 2010. Es por ello que estos resultados se ajustan a los ya descritos por la figura 21 del **Estudio IV.2**. Sin embargo, en este caso, los resultados en otoño y en verano son excepcionalmente altos. El año 2009 puede considerarse un año intermedio en relación a las precipitaciones si lo comparamos con los años 2010 y 2011 (ANEXO III). Así, el total de precipitaciones acumuladas (medidas en mm) en cada uno de los tres años fue de 482, 617 y 370, respectivamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos anteriormente. En el **Estudio IV.2**, se afirmaba que el rendimiento en aceite esencial está muy condicionado por la disponibilidad de agua para la planta y, que a estos efectos, un estrés hídrico de una magnitud moderada aumenta de manera notable el rendimiento obtenido en *S. lavandulifolia*. Una de las funciones biológicas que puede desempeñar la biosíntesis de aceites esenciales es el de la regulación de los procesos de evapotranspiración, los cuales son especialmente importantes en épocas de escasez de precipitaciones. Además, en el área del Mediterráneo el agua es el principal factor limitante para la flora (Rivas Martínez, 1987) y la producción de esencia puede proporcionar una termorregulación que ahorre en su consumo.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está relacionada directamente con su composición química. En este sentido, los mecanismos de acción de los terpenoides no están totalmente resueltos, aunque es probable que impliquen, en la mayoría de los casos, disrupciones en las membranas por compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). De acuerdo con esto, Mendoza *et al.* (1997) describen que una disminución en la hidrofobicidad de ciertos diterpenos por la adición de grupos metilo hace disminuir drásticamente su actividad antimicrobiana. Precisamente, una

importante característica de los aceites esenciales en su conjunto es su hidrofobicidad. Éstos tienen la capacidad de hacer más permeables las membranas lipídicas citoplasmáticas, las membranas de la pared bacteriana de las bacterias Gram negativas y, en organismos eucariotas, de las membranas de las mitocondrias (Burt, 2004).

Las diferencias encontradas en cuanto a la inhibición del crecimiento bacteriano únicamente son significativas a nivel de los microorganismos. Sin embargo, en otras especies como la albahaca (*Ocimum basilicum*), las diferencias descritas son significativas tanto a nivel estacional como a nivel de especie microbiana (Hussain *et al.*, 2008). Las bacterias Gram positivas han mostrado mayor susceptibilidad a los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* que las Gram negativas. Este hecho es esperable debido a su menor complejidad en cuanto a la estructura de la pared bacteriana y, de hecho, la mayoría de la bibliografía va en este sentido (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004). Sin embargo, no todos los estudios llegan a las mismas conclusiones (Wilkinson *et al.*, 2003; Prabuseenivasan *et al.*, 2006), y pueden encontrarse estudios donde la susceptibilidad a los aceites esenciales es mayor en especies bacterianas Gram negativas.

Aunque las diferencias no son significativas en relación a la época de cosecha, generalmente los aceites esenciales de los cultivos en otoño e invierno exhiben las mayores actividades antibacterianas. La presencia de compuestos como el 1,8-cineol, alcanfor y borneol es mayor durante estos estadíos. En este sentido, otros estudios han revelado la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Knobloch *et al.*, 1986; Tabanca *et al.*, 2001; Tzakou *et al.*, 2001). Generalmente, los aceites esenciales de material vegetal cosechado durante o inmediatamente después de la floración exhiben las mayores actividades antibacterianas (Burt, 2004). Además, la presencia de compuestos oxigenados en el aceite esencial parece favorecer la actividad antimicrobiana (Hussain *et al.*, 2008).

La efectividad de algunos aceites esenciales contra agentes infecciosos de las plantas ha sido constatada por Soylyu *et al.* (2006), indicando que su acumulación en los tricomas glandulares después de la floración y durante el otoño y el invierno, puede tener efectos de profilaxis y protección frente a bacterias y hongos oportunistas infecciosos. Ciertos terpenoides son importantes en la resistencia a enfermedades causadas por bacterias y hongos (Gershenzon & Dudareva, 2007). El compuesto 1,8-cineol es el mayoritario en las esencias de algunas de las especies del género *Salvia*. Este compuesto se ha mostrado como el de mayor actividad antibacteriana de los

mayoritarios que forman parte de los aceites esenciales de *S. mirzayanii* y *S. hydrangea* (Sanboli *et al.*, 2006). La actividad antibacteriana, sin embargo, es probablemente debida a los efectos sinérgicos entre los compuestos mayoritarios de las esencias y los otros constituyentes, cada uno con diversos grados de actividad. La acumulación en el sustrato de las hojas una vez se desprenden de la planta puede incorporar al suelo los terpenoides que forman parte del aceite esencial. Compuestos del metabolismo secundario en contacto con el suelo cambian su estructura microbiana, reduciendo el número de hongos y aumentando el de las bacterias (Letessier *et al.*, 2001).

Por último, otros trabajos comparan la efectividad de los aceites esenciales testados frente a antibióticos comerciales. Nuestro trabajo no toma tal consideración debido a la diferente solubilidad y dispersión de los antibióticos y los aceites esenciales en el medio de crecimiento bacteriano. En este trabajo únicamente se han considerado como controles positivos.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

El metabolismo de los terpenoides no es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, de hecho, las especies que no biosintetizan ni emiten estos compuestos a la atmósfera se desarrollan y multiplican adaptadas a sus hábitats. Sin embargo, existen evidencias que muestran a estos compuestos en su importante papel en relación a la interacción entre las plantas y el medioambiente.

Cuando se pretende aprovechar un producto de origen vegetal de manera industrial o comercial, es fundamental considerar que la materia prima debe lograr mantener su disponibilidad e invariabilidad, como una garantía de la calidad del producto final. Además, y previamente, debe estar especificado de la manera más concreta posible el perfil químico del producto deseado. Debe, por tanto, quedar establecido que un aceite esencial es indicado para un uso concreto si posee una composición química específica. Bajo estas premisas, es un hecho ineludible considerar la diversidad y variabilidad fitoquímica demostradas por muchas especies de plantas aromáticas y medicinales. En muchos casos, esta variabilidad se identifica como un problema de cara a mantener una homogeneidad en la materia prima, pero por otro lado, la diversidad puede fortalecer la oferta de un producto si se evalúan de manera correcta los factores que la determinan y su incidencia en la calidad del producto final.

El presente trabajo revela, por primera vez, que el control ejercido sobre la composición química de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* Vahl., es mayoritariamente de origen genético. Las diferencias encontradas con respecto a la composición química de los aceites esenciales sugieren diferencias genéticas entre los pies individuales de *S. lavandulifolia*. Además, la determinación sobre la capacidad de fijación de estos caracteres químicos en relación a cambios ambientales, puede proporcionar una fuente potencial de diferentes patrones fitoquímicos en cuanto a calidad de las esencias, lo cual puede ser útil para mejorar sus aplicaciones comerciales. Sin embargo, existe todavía poca información sobre la diversidad bioquímica que ofrece esta especie en relación a los aceites esenciales y otros productos derivados de su metabolismo secundario.

Estudios publicados previamente muestran que la variación en la composición química de los aceites esenciales en las poblaciones naturales está asociada, en gran parte, a diferencias en el perfil genético (Skoula *et al.*, 1996; Trindade *et al.*, 2009; Paolini *et al.*, 2010). Ciertos autores sugieren que suponiendo un sistema jerárquico de

factores condicionantes del metabolismo de los derivados terpénicos, el factor genético ocuparía una situación basal, mitigando o amortiguando los efectos medioambientales en el metabolismo secundario (Hamilton *et al.*, 2001). Una mejor comprensión de los factores que determinan la biosíntesis de los terpenoides supone un avance en la modelización y predicción de la calidad de metabolitos secundarios producidos por las especies de interés comercial bajo diferentes condiciones ambientales y geográficas. Como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, la fracción química extraída de los aceites esenciales puede llegar a ser extremadamente compleja y sus propiedades no suelen estar determinadas por un compuesto concreto, sino que, la proporcionalidad de todos ellos es la que determina la calidad del producto. Por este motivo, en la mayoría de los casos, los aceites esenciales son el producto comercial final y no los compuestos químicos individuales que lo forman. Únicamente compuestos como el eugenol, timol, cedrol, citronelal o el 1,8-cineol, son compuestos que se aíslan de los aceites esenciales debido a la alta concentración en que se pueden encontrar en algunos de ellos (Bandoni *et al.*, 2009). En el caso del cultivo de *S. lavandulifolia*, si el objetivo principal del cultivo fuera el de la extracción del compuesto 1,8-cineol, la época óptima de recolección sería durante los estadios de baja actividad metabólica, momentos en los cuales la concentración relativa de dicho compuesto alcanza sus máximos niveles. Además, condiciones de secano para este cultivo favorecerían la acumulación de dicho compuesto.

Los diversos procesos bioquímicos que intervienen en la formación de los aceites esenciales (figura 2) dan lugar a mezclas complejas. Además, muchos de ellos tienen distintos orgánulos celulares de formación y, como se pone de manifiesto en la figura 15, hasta sus propios momentos fenológicos u ontogenéticos. Es por ello, que la calidad de un aceite esencial puede estar determinada por diversas variables (genéticas, medioambientales y culturales). La enorme variabilidad existente de casi cualquier aceite esencial, hace indispensable un estudio detallado de cualquiera de ellos que se presente con una finalidad concreta. En general, no puede realizarse una descripción de la composición química de un determinado aceite esencial sintetizado por una especie con una analítica concreta. En las plantas aromáticas, la evaluación de numerosos individuos o poblaciones es una necesidad ineludible. Por otro lado, los estudios prospectivos de las especies en sus hábitats naturales son igualmente fundamentales para poder evaluar la homogeneidad y plasticidad que pueda justificar con fundamentos la utilidad que se presupone al aceite esencial de una determinada especie. Como se ha



puesto de manifiesto, es casi imposible encontrar dos aceites esenciales idénticos en su composición química e incluso, suponiendo materia prima proveniente de un mismo quimiotipo (pie de planta individual), siempre se pueden encontrar diferencias por la época de cosecha, la pluviometría de la temporada, la afectación del cultivo por plagas o enfermedades y el método de extracción o almacenamiento. Por ello, después de estos estudios detallados en cuanto a la fijación de caracteres y variabilidad debido a cambios ambientales, afirmamos que sería más conveniente aportar la composición química en rangos o intervalos de confianza (acotar su variabilidad) de manera que puedan ser aceptables para conseguir la funcionalidad que se presupone.

Un quimiotipo expresa una modificación en la estructura genética de la planta, y su interés científico radica en la posibilidad de emplear la composición química como indicadora de la existencia de esta diversidad genética que se pone de manifiesto no en diferencias morfológicas, sino en características metabólicas. El estudio de la existencia de quimiotipos presenta un interés aplicado cuando la utilidad de una especie se basa en la composición química de alguno de sus extractos, cuyas concentraciones entre los distintos individuos pueden variar de forma notable. Para poder afirmar que una variación cuantitativa identifica efectivamente a un quimiotipo deben evaluarse las posibles modificaciones debidas al ambiente, con distintas condiciones de cultivo durante varios años. El objetivo principal de este trabajo fue el de evaluar la variabilidad química de los aceites esenciales observada en las poblaciones naturales para obtener así, un conocimiento sobre la variación genética presente en *Salvia lavandulifolia* en comparación con la variabilidad debida a los principales factores ambientales.

Estudios genotipo-ambiente, con material vegetal proveniente de diferentes localizaciones geográficas, muestran el mantenimiento de la identidad química entre los distintos años de estudio en *Salvia officinalis*, si bien, con una sólo muestra recolectada por campaña (Lamien-Meda *et al.*, 2009). En nuestro estudio se observa como, en general, se mantienen las características químicas de las plantas cultivadas de esta especie entre las distintas campañas. Sin embargo, las condiciones climáticas pueden introducir cierta variabilidad cuantitativa respecto a la composición química.

Tomados en su conjunto, de entre los genotipos de trabajo provenientes de recolección silvestre, podemos proponer la existencia de ciertos quimiotipos principales descritos a partir de los compuestos con  $D_{mah}$  superior al valor crítico (tabla 16). El compuesto mayoritario que separa en dos grupos a los individuos con los que se ha trabajado es el 1,8-cineol. Los individuos A2, A3, C1, y C2 tienen un contenido bajo de

1,8-cineol (contenido medio del 20% o inferior) y, los restantes, se podrían clasificar cómo de quimiotipo 1,8-cineol (contenido medio de alrededor del 50% o superior). Además, algunos de estos genotipos tienen características que les hacen distinguibles. Como ejemplo, en la figura 24 se muestran estas diferencias en el estadio de plena floración. El genotipo A3 se caracteriza por el alto contenido de canfeno, limoneno y *trans*-cariofileno. El genotipo C1 se caracteriza por la presencia del compuesto espatulenol. Finalmente, el genotipo C2 resume su identidad química, además de en el contenido bajo de 1,8-cineol, en la presencia elevada de *trans*-cariofileno. Estos últimos compuestos, por ser característicos de cada uno de estos genotipos de manera estable durante todo el seguimiento fenológico y, bajo condiciones ambientales distintas, se podrían considerar en cada caso como compuestos “marcadores” de cada quimiotipo determinado.

De entre los genotipos agrupados en torno a su elevado contenido en 1,8-cineol, también existen algunos individuos con presencia de compuestos marcadores. Así, los genotipos B1 y B2 poseen como compuesto marcador de sus esencias al viridiflorol, el cual sólo se detecta en proporciones traza en el resto de individuos.

Nuestros resultados muestran como estos genotipos son distinguibles unos de otros de manera estable a lo largo del tiempo en base a la composición química de sus aceites esenciales. En este sentido, la causa más relevante de variabilidad fitoquímica fueron los genotipos. Los efectos causados por las diferentes condiciones ambientales son de menor magnitud.

El conocimiento sobre esta plasticidad fitoquímica en los aceites esenciales entre las poblaciones naturales puede contribuir a la conservación de germoplasma de esta especie en condiciones *in situ* y *ex situ*. Nuestros resultados muestran numerosas implicaciones para las estrategias de conservación de *S. lavandulifolia* por la información que proporcionan sobre la variación fitoquímica existente entre las poblaciones naturales y dentro de las mismas. Además, ciertos individuos, dadas las características químicas de sus aceites esenciales, podrían ser susceptibles de selección como parentales para cruzamientos de mejora y preservación en bancos de germoplasma y/o propagación vegetativa.

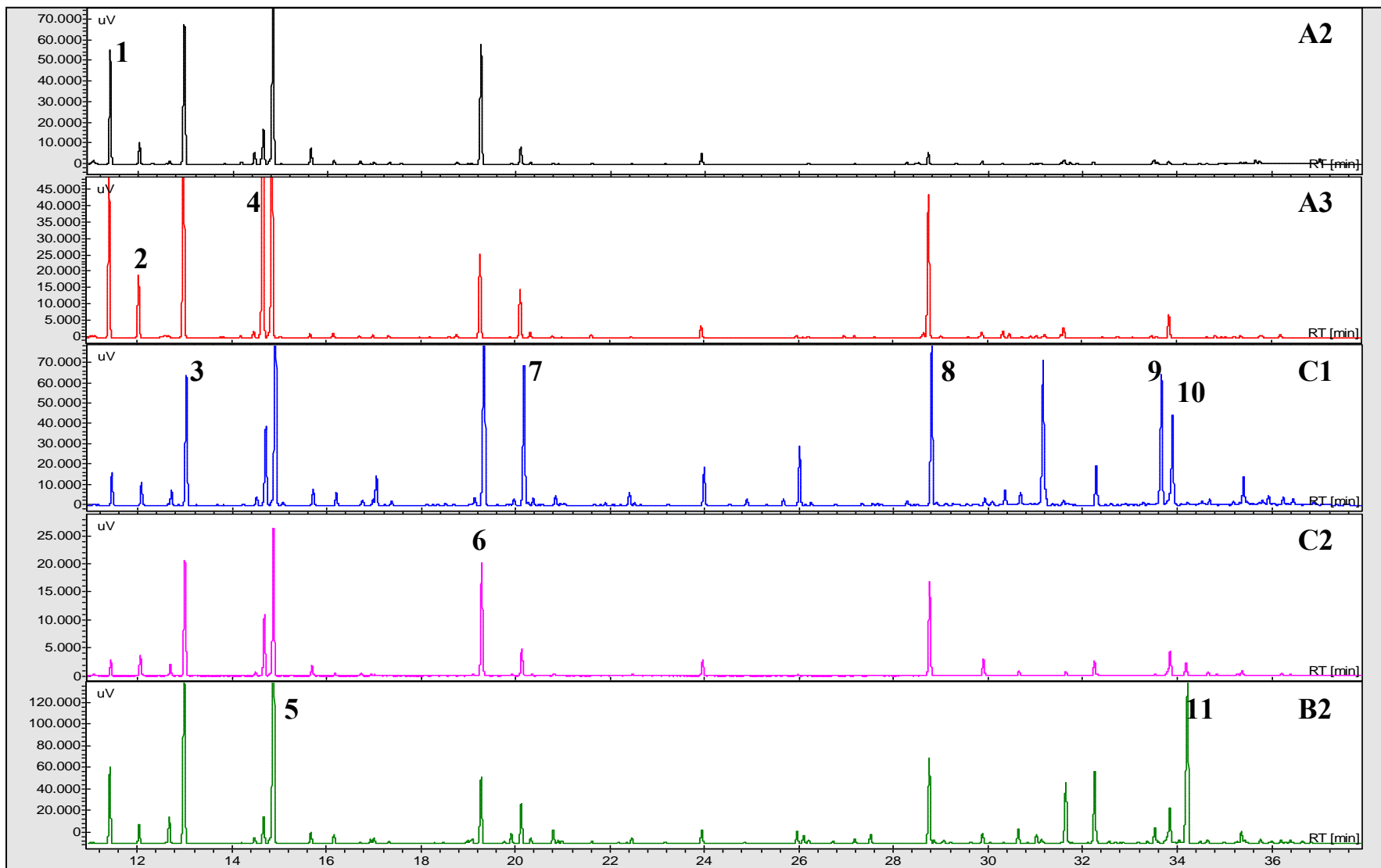


Figura 24.- Cromatogramas característicos de algunos de los genotipos de *S. lavandulifolia* en estadio de plena floración. Los números indican la posición de los compuestos más característicos de estas esencias.  $\alpha$ -pineno (1), canfeno (2),  $\beta$ -pineno + mirceno (3), limoneno (4), 1,8-cineol (5), alcanfor (6), borneol (7), *trans*-cariofileno (8), espatuleno (9), óxido de cariofileno (10) y viridiflorol (11).

Existen, por tanto, importantes diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los diferentes genotipos evaluados de *S. lavandulifolia*. Esto es así, para la composición química, sin embargo, el rendimiento en aceite esencial viene condicionado principalmente por la climatología imperante en las parcelas de cultivo. Por otro lado, otros estudios han demostrado que los diferentes rendimientos reflejan también la variabilidad genética en otras especies (Gil *et al.*, 2007; Hosni *et al.*, 2010).

Los quimiotipos (o fenotipos químicos) son generalmente considerados como la expresión fenotípica de un genotipo, aunque según ciertos autores diferentes quimiotipos pueden derivar de un mismo genotipo. Esto significa que, de acuerdo con las condiciones ambientales, el mismo genotipo puede expresar diferente patrón químico o, contrariamente, que diferentes genotipos pueden responder ante la misma presión ambiental con la misma expresión fenotípica (Rubiolo *et al.*, 2009). En este contexto, estudios multidisciplinarios con técnicas basadas en el ADN, que focalizan la caracterización en el genotipo en lugar de en el fenotipo, están siendo utilizados actualmente para la identificación y caracterización de los quimiotipos en especies de plantas medicinales. Debido a la plasticidad fenotípica que presentan estas especies, la complementación de los métodos taxonómicos tradicionales de identificación, con métodos fitoquímicos basados en GC/MS y con métodos biomoleculares basados en PCR como RFLP-PCR o RAPD-PCR, se muestra actualmente como una herramienta de gran utilidad, no sólo para la taxonomía botánica, sino también para la correcta caracterización de especies de interés industrial y productoras de aceites esenciales. Especies con un marcado poliformismo fitoquímico también muestran una importante variabilidad a nivel genómico (Boszorményi *et al.*, 2009; Gnani *et al.*, 2010). Además, las poblaciones naturales son normalmente heterogéneas y están compuestas por diferentes quimiotipos (Echeverrigaray *et al.*, 2001). El hábitat ejerce una presión selectiva que puede ser detectada no solo a nivel fenotípico (similar composición química de los aceites esenciales) sino también a nivel genómico (por ejemplo, similar secuencia del gen 5S-rRNA-NTS) (Gnani *et al.*, 2010). Aunque debido a que el material vegetal con el que hemos trabajado se ha desarrollado bajo unas mismas condiciones, podemos afirmar que hemos controlado el efecto del ambiente y, por lo tanto, las diferencias descritas se deben al factor genético, sería conveniente corroborar esta hipótesis con métodos basados en ADN. De esta manera se podría evaluar el paralelismo existente entre los quimiotipos (fenotipos químicos) y los genotipos individuales distinguibles molecularmente.

En la bibliografía es común encontrar quimiotipos descritos a partir de una sola muestra recolectada en un estadio concreto del ciclo biológico de la especie, normalmente floración. Estas propuestas de quimiotipos se dan tanto en poblaciones naturales (Skoula *et al.*, 1996; D'Antuono *et al.*, 2000; Maksimovic *et al.*, 2007; Tommasi *et al.*, 2007) como cuando el material vegetal multiplicado e implantado en cultivo se desarrolla bajo unas mismas condiciones ambientales (Loziene & Venskutonis, 2005; Lamien-Meda *et al.*, 2009). En base a los resultados de este trabajo, esta manera de definir quimiotipos puede resultar insuficiente debido a la variabilidad mostrada por especies como *S. lavandulifolia* a lo largo de su ciclo biológico. Otras especies han mostrado también fluctuaciones significativas en cuanto a la composición química en los distintos estadios fenológicos (Perry *et al.*, 1999; Santos Gomes & Fernandez-Ferreira, 2001; Masotti *et al.*, 2003; Curado *et al.*, 2006; Jordán *et al.*, 2006). En consecuencia, la propuesta de quimiotipos en base a una muestra concreta corre el riesgo de no determinar correctamente las características fitoquímicas que se pretenden definir y, por lo tanto, se hacen absolutamente necesarios estudios más amplios que abarquen diferentes estadios del ciclo biológico y diferentes condiciones ambientales. Sólo de esta manera se puede determinar la composición química *real* que tienen los aceites esenciales de una determinada especie o que deben tener para poder demostrar sus verdaderas cualidades.

## VI.- CONCLUSIONES

1. La especie *Salvia lavandulifolia* Vahl. posee una gran plasticidad fitoquímica en relación a la composición química de los aceites esenciales. Esta variabilidad se pone de manifiesto en las poblaciones naturales tanto a nivel interpoblacional como intrapoblacional. Concretamente, la variabilidad fitoquímica está muy marcada dentro de ciertas poblaciones naturales en esta especie.
2. La composición química de los aceites esenciales de las prospecciones en las poblaciones naturales muestra una variabilidad muy superior a la recogida por la normativa en relación a la calidad.
3. Esta especie acumula la mayor cantidad de aceite esencial cuando sus semillas están completamente maduras. Se ha constatado que los rendimientos en plena floración son moderados en relación a otros estadios fenológicos.
4. El rendimiento en aceite esencial en esta especie está condicionado principalmente por factores climáticos como la temperatura y la pluviometría. Condiciones de estrés hídrico moderado aumentan significativamente el rendimiento en aceite esencial.
5. Genotipos con orígenes geográficos distintos y desarrollados bajo unas mismas condiciones ambientales, mantienen las características químicas de los aceites esenciales que les hacían distinguibles en las poblaciones naturales.
6. Los compuestos canfeno, limoneno, 1,8-cineol, *trans*-cariofileno y espatulenol pueden emplearse para definir posibles quimiotipos en *S. lavandulifolia*.
7. Pueden considerarse como de quimiotipo 1,8-cineol los individuos con un porcentaje relativo medio de alrededor del 50% o superior para este compuesto.
8. El quimiotipo limoneno/*trans*-cariofileno se caracteriza por porcentajes relativos medios de alrededor del 17 y 11%, respectivamente. La presencia en esta especie del compuesto espatulenol en porcentajes relativos medios de alrededor del 4% se puede considerar un marcador de este quimiotipo.
9. La variable fertilización nitrogenada parece no tener efectos significativos sobre la calidad de los aceites esenciales. Sin embargo, es necesario trabajar con material homogéneo o, en su defecto, previamente caracterizado, para llegar a conclusiones fehacientes sobre la influencia de los factores ambientales.

10. El estrés ocasionado por altas temperaturas modifica de manera notable la composición química de los compuestos orgánicos volátiles almacenados en los tricomas glandulares. Sin embargo, los distintos genotipos pueden responder de manera cuantitativamente distinta ante la misma situación de estrés.
11. Los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* tienen mayor efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas. Si bien estos efectos no muestran diferencias significativas entre las distintas épocas del año, en todos los casos, los aceites esenciales extraídos en otoño e invierno presentan las mayores capacidades antibacterianas.
12. La especie *S. lavandulifolia* se presenta como un excelente modelo a la hora de investigar la fijación de caracteres fitoquímicos para el establecimiento de quimiotipos o la creación de variedades con mejores características agronómicas y comerciales.

## VII. ANEXOS

## ANEXO I

VII.1. Composición química de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* Vahl.

En este Anexo se exponen, por orden de elución en la columna cromatográfica DB-5, todos los compuestos detectados en los aceites esenciales de *S. lavandulifolia*. En cada tabla se indican los índices de Kóvats relativos a los n-alcenos, los porcentajes relativos de cada uno de los compuestos, el porcentaje total identificado respecto del total integrado y los porcentajes de los compuestos agrupados conforme a su estructura química en monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados.

## VII.1.1. Genotipos y poblaciones naturales

Se exponen a continuación los resultados completos de composición química tanto de los genotipos como de las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia* que han sido objeto de estudio. El origen geográfico puede consultarse en la tabla 5.

Tabla A.- Composición química de los genotipos seleccionados de *S. lavandulifolia*.

Compuesto	I.K	GENOTIPOS											
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
tricieno	930	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -tuyeno	932	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
$\alpha$ -pineno	943	4,8	3,3	8,3	8,4	7,0	3,3	0,4	1,4	10,0	6,8	3,5	11,5
canfeno	962	8,1	1,4	3,8	1,6	1,7	0,4	0,2	1,5	0,9	1,5	1,4	0,4
sabineno	981	0,1	3,1	0,1	3,4	3,4	3,4	0,2	1,2	4,7	3,5	3,1	3,5
$\beta$ -pineno + mirceno	991	14,5	13,7	14,2	16,0	14,3	14,7	2,0	16,7	14,6	13,2	13,5	17,2
$\alpha$ -terpineno	1010	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>p</i> -cimeno	1033	1,0	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4	0,1	0,9	0,2	0,4	0,5	0,6
limoneno	1038	4,9	3,6	17,8	2,3	2,3	4,4	1,6	13,8	8,1	3,8	3,6	3,7
1,8-cineol	1044	18,6	49,0	21,8	47,3	48,7	55,5	1,1	3,7	40,3	48,6	48,9	43,8
$\gamma$ -terpineno	1066	0,7	1,1	0,5	1,1	0,8	1,0	0,4	4,3	0,9	0,7	1,1	1,2



## ANEXO I.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Compuesto	I.K	GENOTIPOS											
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
<i>cis</i> -sabineno hidrato	1079	0,5	1,1	0,5	0,7	0,8	0,9	0,1	0,1	0,4	0,9	1,1	0,7
terpinoleno	1094	0,4	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,1	0,1	0,2	0,1
linalol	1102	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5	2,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4
<i>allo</i> -ocimeno	1111	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
alcanfor	1165	24,3	5,5	7,4	2,8	3,9	1,4	3,5	5,4	0,5	3,1	5,3	2,3
óxido de $\beta$ -pineno	1182	0,1	0,8	0,1	0,7	0,9	0,9	0,3	-	0,2	0,7	0,8	0,8
borneol	1187	4,6	2,2	3,1	1,2	1,5	0,5	2,8	1,5	0,5	1,5	2,2	0,2
terpinen-4-ol	1193	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3
$\alpha$ -terpineol	1206	0,1	1,1	0,2	1,0	1,3	1,3	0,6	0,1	0,1	2,5	1,3	1,0
mirtenol	1213	-	-	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-
<i>trans</i> -carveol	1230	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
nerol	1245	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	0,1	-
geraniol	1250	-	-	-	-	-	-	0,5	0,1	-	-	-	-
acetato de linalilo	1254	0,5	0,3	0,1	0,4	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5
geranial	1274	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1
acetato de bornilo	1296	2,3	0,6	1,8	0,6	0,7	0,1	1,5	1,9	0,4	0,6	0,6	
acetato de terpinen-4-ol	1322	-	-	-	0,1	0,1	-	0,3	-	-	-	-	-
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1355	-	0,3	0,4	0,6	0,7	0,4	3,4	0,1	-	0,1	0,3	-
$\alpha$ -cubebeno	1359	0,1	-	0,1	0,2	0,2	-	0,1	-	-	-	-	0,1
acetato de geranilo	1381	0,1	0,1	0,1	0,4	0,5	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3
$\alpha$ -copaeno	1392	0,2	-	0,2	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -cubebeno	1405	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1
$\beta$ -gurjuneno	1427	-	0,1	0,1	-	-	-	0,4	-	0,2	-	0,1	-
$\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoteno	1438	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	1441	3,6	2,2	9,1	1,3	1,3	3,1	10,2	15,9	1,1	3,4	2,4	3,7
$\alpha$ -bergamoteno	1445	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,3	0,3	-	-	0,1	-
(Z)- $\beta$ -farneseno	1451	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,2	0,2	-	-	0,1	-
aromadendreno	1460	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
$\alpha$ -humuleno	1469	0,4	0,3	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,5	0,4	0,3	0,1
(E)- $\beta$ -farneseno	1477	2,6	2,5	0,4	0,2	0,1	1,3	0,6	2,4	0,4	1,8	2,7	0,6
<i>allo</i> -aromadendreno	1482	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>ar</i> -curcumeno	1491	-	0,2	0,5	-	-	-	1,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4
valenceno	1501	-	-	-	-	-	0,1	0,4	0,1	-	-	-	0,4
$\beta$ -himachaleno	1506	0,2	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
$\gamma$ -muuroleno	1508	0,2	-	0,1	0,2	0,2	0,1	-	-	-	-	-	0,1
biciclogermacreno	1514	-	0,2	-	0,2	0,2	-	7,6	0,7	0,2	-	0,3	-

ANEXO I.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Compuesto	I.K	GENOTIPOS											
		A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3
$\alpha$ -zingibereno	1519	-	-	0,4	-	-	-	2,1	-	0,2	0,1	-	0,1
cubebol	1534	-	-	-	0,8	0,9	-	-	-	-	-	-	0,2
$\delta$ -cadineno	1539	-	-	-	-	-	-	0,3	0,2	-	-	-	-
$\beta$ -bisaboleno	1555	-	1,0	-	1,4	1,5	0,4	6,7	6,0	-	0,2	0,9	-
$\beta$ -sesquifelandreno	1566	-	-	0,1	-	-	-	0,4	0,2	-	-	-	-
germacreno D	1598	0,1	0,2	-	0,3	0,2	0,1	-	0,3	0,8	0,1	0,2	0,1
espatulenol	1600	-	0,2	-	-	-	-	18,4	0,7	0,6	-	0,2	-
óxido de cariofileno	1609	0,6	0,8	1,4	0,5	0,6	2,0	6,9	7,6	0,4	1,9	0,9	1,8
viridiflorol	1621	2,3	0,1	-	2,6	2,7	-	0,3	0,1	0,1	0,1	-	-
cubenol	1658	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	-	-	0,2	0,2	0,2	-
vulgarona B	1663	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	1,0	1,1	0,2	0,3	0,2	0,3
$\beta$ -eudesmol	1682	-	-	-	-	-	-	2,2	0,4	0,1	0,1	-	-
$\alpha$ -eudesmol	1686	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,6	0,4	0,1	-	0,1	-
$\alpha$ -cadinol	1709	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-	0,1
tiglato de geranilo	1718	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
manool	2085	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,4
<b>% Total identificado</b>		<b>97,7</b>	<b>97,9</b>	<b>95,6</b>	<b>98,4</b>	<b>99,2</b>	<b>98,2</b>	<b>84,4</b>	<b>92,2</b>	<b>88,7</b>	<b>98,4</b>	<b>98,1</b>	<b>97,8</b>
Monoterpenos hidrocarbonados		33,8	26,1	45,3	32,4	29,4	27,0	4,5	35,9	38,9	29,6	26,1	33,8
Monoterpenos oxigenados		53,8	63,4	38,6	58,2	61,8	63,8	18,7	18,9	44,5	60,1	63,3	52,1
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>87,6</b>	<b>89,5</b>	<b>83,9</b>	<b>90,6</b>	<b>91,2</b>	<b>90,8</b>	<b>23,2</b>	<b>54,8</b>	<b>83,4</b>	<b>89,7</b>	<b>89,4</b>	<b>85,9</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		7,1	6,9	10,6	4,8	4,8	5,3	31,0	27,0	3,4	6,2	7,3	5,8
Sesquiterpenos oxigenados		3,1	1,6	1,7	3,3	3,5	2,5	29,5	10,3	2,0	2,6	1,6	2,6
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>10,2</b>	<b>8,5</b>	<b>12,3</b>	<b>8,1</b>	<b>8,3</b>	<b>7,8</b>	<b>60,5</b>	<b>37,3</b>	<b>5,4</b>	<b>8,8</b>	<b>8,9</b>	<b>8,4</b>

Tabla B.- Composición química de los aceites esenciales extraídos de las poblaciones naturales de *S. lavandulifolia*.

COMPUESTOS	I.K	POBLACIONES																				
		Bm	Pb	Vg	Cv	Vd	Pr	Ad	Sp	Vu	Vr	Va	Vm	Hu	Ga	Ba	A	B	C	D	Le	Mo
tricicleno	930	0,4	0,2	0,3	0,3	0,6	0,2	0,1	0,6	0,5	0,4	0,2	0,1	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
$\alpha$ -tuyeno	931	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	-	0,2	0,1	0,1	-	-	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
$\alpha$ -pineno	942	6,8	4,9	9,6	9,6	7,2	5,3	3,9	6,8	7,6	7,2	5,7	6,8	7,6	7,7	6,8	9,3	5,6	6,1	7,7	3,0	4,2
canfeno	961	3,9	3,7	8,3	4,8	5,2	5,9	4,3	4,5	9,6	9,1	4,9	5,7	3,5	5,0	8,0	3,5	1,2	2,0	0,6	5,2	8,3
octen-3-ol	979	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-
sabineno	981	0,4	0,5	0,1	0,1	0,1	0,8	0,7	0,1	0,1	0,1	0,6	0,8	0,1	0,1	0,1	0,2	3,6	3,4	3,5	0,4	1,3
$\beta$ -pineno + mirceno	991	11,8	16,7	10,1	10,6	11,2	9,2	12,1	11,0	13,8	10,2	11,0	11,8	17,6	11,3	13,9	14,1	11,0	11,5	13,4	4,8	5,1
$\alpha$ -terpineno	1025	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2		0,1	0,1	0,1	0,1
<i>p</i> -cimeno	1032	2,0	2,6	3,0	2,9	2,2	1,1	0,8	2,2	3,8	2,5	0,8	1,0	2,5	2,5	2,2	1,5	0,6	0,8	1,1	0,7	0,5
limoneno	1038	9,1	9,4	12,3	10,5	8,5	7,8	7,0	10,0	9,9	8,1	9,5	9,3	7,6	11,3	11,0	11,8	2,8	8,0	3,5	3,5	3,0
1,8-cineol	1044	28,0	35,6	26,2	32,0	23,8	22,9	26,5	26,2	15,2	18,4	26,4	31,1	37,6	24,8	20,7	32,9	49,3	42,3	53,4	22,9	24,8
$\gamma$ -terpineno	1065	0,4	0,9	0,2	0,2	0,3	0,7	0,3	0,1	0,3	0,2	0,4	0,7	0,2	0,4	0,3	0,5	0,3	0,7	0,8	0,1	0,2
<i>cis</i> -sabineno hidrato	1079	0,5	0,5	0,1	0,2	0,6	0,6	0,7	0,1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,1	0,5	0,2	0,5	0,8	0,6	0,7	0,2	0,6
terpinoleno	1094	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
linalol	1102	0,2	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	2,6	0,6
<i>allo</i> -ocimeno	1111	0,3	0,3	0,1	0,2	0,5	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
$\alpha$ -tuyona	1129	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,1
$\beta$ -tuyona	1132	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1
alcanfor	1164	20,3	7,0	12,9	10,3	12,1	24,7	11,4	16,8	20,8	22,1	10,1	12,5	10,2	19,5	18,8	10,4	2,0	9,4	1,9	28,5	28,6
óxido de $\beta$ -pineno	1181	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	1,0	0,2	0,8	0,2	0,4
borneol	1187	2,7	3,4	3,7	3,7	4,5	4,5	6,1	2,7	2,5	5,3	6,8	4,3	1,6	2,3	4,4	2,7	1,2	2,7	0,5	4,7	3,5
terpinen-4-ol	1193	0,7	0,7	0,7	0,6	1,2	0,5	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,7	0,8	1,0	0,7	0,6	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5
$\alpha$ -terpineol	1206	0,6	0,1	0,3	0,5	0,8	0,3	0,7	0,2	0,3	0,6	0,5	0,9	0,1	0,4	0,2	0,2	1,0	0,2	1,3	0,8	0,4
mirtenol	1211	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2

COMPUESTOS	I.K	POBLACIONES																				
		Bm	Pb	Vg	Cv	Vd	Pr	Ad	Sp	Vu	Vr	Va	Vm	Hu	Ga	Ba	A	B	C	D	Le	Mo
<i>trans</i> -carveol	1229	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1
geraniol	1251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	2,8	-
acetato de linalilo	1253	0,3	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,1	0,4	0,1	0,8	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,4	0,9	0,4
geranial	1274	0,1	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
acetato de bornilo	1295	-	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	0,3	0,2	0,2	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
acetato de terpinen-4-ol	1321	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	-
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1355	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,7	0,1	0,1	-	-	0,5	-	0,1	0,1	0,1	0,3	1,5	0,5	0,2	0,7	0,5
$\alpha$ -copaeno	1392	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,3	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-	-	-	-
$\beta$ -cubebeno	1405	-	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-
$\beta$ -gurjuneno	1427	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,1	-	-	-	0,1	-
<i>trans</i> -cariofileno	1441	0,4	1,0	1,4	2,0	0,7	1,4	0,9	0,9	0,9	0,8	1,4	0,8	0,7	1,1	0,9	2,7	0,9	1,4	1,7	0,5	0,3
aromadendreno	1460	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	-	-	0,1	0,3	0,1	0,1	-	0,2	0,2	0,1	-	-	-	-	0,1	-
( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1477	0,2	0,7	1,1	1,1	0,4	0,2	0,1	1,4	0,8	0,5	0,8	0,2	0,2	0,6	1,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,5	0,1
<i>ar</i> -curcumeno	1491	0,1	-	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,2	0,3	-	0,1	0,1	0,1	-
valenceno	1500	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
$\gamma$ -muuroleno	1511	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1	-
cubebol	1534	0,2	0,3	0,2	0,3	0,5	0,4	0,2	0,7	0,2	0,4	0,3	0,3	0,5	0,7	0,3	0,3	0,8	-	-	0,2	-
$\delta$ -cadineno	1540	0,1	-	-	0,1	0,2	-	-	0,4	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,2	0,1	-	-	-	-	0,1	-
$\beta$ -bisaboleno	1555	-	-	-	0,1	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	-	0,5	-	0,1	-	-	0,2	1,2	0,7	-	-	-
germacreno D	1598	0,1	0,2	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	-	0,1	0,2
espatulenol	1600	0,6	0,5	-	0,2	0,1	1,4	2,5	-	0,2	0,1	1,0	0,5	0,1	-	0,1	-	0,1	1,0	0,2	0,6	0,7
óxido de cariofileno	1609	0,9	1,0	1,1	1,7	1,5	2,6	3,9	1,1	1,6	1,3	3,3	1,8	1,0	0,9	0,9	1,4	2,4	2,5	2,9	1,0	0,7
viridiflorol	1621	0,8	0,7	2,6	0,1	7,6	1,5	6,7	1,8	2,4	3,7	3,5	1,8	0,1	0,8	2,4	0,1	3,0	0,1	-	3,4	0,2
cubenol	1660	-	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,2	0,1	0,3	-	-
vulgarona B	1663	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,5	0,3	0,4	0,6	0,2
$\beta$ -eudesmol	1679	0,1	-	0,2	0,2	0,2	-	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	-	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	-	-	-	-
$\alpha$ -eudesmol	1693	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,5	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1

COMPUESTOS	I.K	POBLACIONES																				
		Bm	Pb	Vg	Cv	Vd	Pr	Ad	Sp	Vu	Vr	Va	Vm	Hu	Ga	Ba	A	B	C	D	Le	Mo
manool	2085	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-
<b>% Total identificado</b>		<b>94,0</b>	<b>94,0</b>	<b>96,6</b>	<b>95,8</b>	<b>93,4</b>	<b>96,1</b>	<b>94,1</b>	<b>92,6</b>	<b>94,7</b>	<b>95,0</b>	<b>94,0</b>	<b>95,0</b>	<b>95,6</b>	<b>94,8</b>	<b>96,2</b>	<b>97,0</b>	<b>93,9</b>	<b>97,3</b>	<b>97,6</b>	<b>92,0</b>	<b>86,8</b>
Monoterpenos hidrocarbonados		34,9	38,5	44,0	39,1	35,6	30,8	29,2	35,4	45,7	37,9	33,0	35,9	39,7	38,9	42,7	41,0	25,0	32,2	30,3	17,9	22,8
Monoterpenes oxigenados		55,7	50,6	45,7	49,5	45,8	57,0	49,1	48,6	41,9	49,7	49,0	53,1	52,2	51,0	46,9	50,4	59,1	58,6	61,5	66,4	61,2
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>90,6</b>	<b>89,1</b>	<b>89,7</b>	<b>88,6</b>	<b>81,4</b>	<b>87,8</b>	<b>78,3</b>	<b>84,0</b>	<b>87,6</b>	<b>87,6</b>	<b>82,0</b>	<b>89,0</b>	<b>91,9</b>	<b>89,9</b>	<b>89,6</b>	<b>91,4</b>	<b>59,1</b>	<b>90,8</b>	<b>91,8</b>	<b>84,3</b>	<b>84,0</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		1,3	2,5	3,1	4,6	2,4	2,5	1,6	4,5	2,7	2,1	3,6	1,6	2,3	3,1	2,9	3,9	3,2	2,6	2,2	1,7	0,6
Sesquiterpenos oxigenados		2,6	2,6	4,3	2,7	9,8	6,3	14,4	4,0	4,8	5,7	8,8	4,7	1,8	2,1	3,8	2,2	6,5	4,2	4,1	5,8	1,9
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>3,9</b>	<b>5,1</b>	<b>7,4</b>	<b>7,3</b>	<b>12,2</b>	<b>8,8</b>	<b>16,0</b>	<b>8,5</b>	<b>7,5</b>	<b>7,8</b>	<b>12,4</b>	<b>6,3</b>	<b>4,1</b>	<b>5,2</b>	<b>6,7</b>	<b>6,1</b>	<b>9,7</b>	<b>6,8</b>	<b>6,3</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>

## VII.2. Seguimiento fenológico

## VII.2.1. Campaña 2010

Se expone en este apartado la composición química de los aceites esenciales de las 6 recolecciones de material vegetal de los 11 genotipos cultivados de *S. lavandulifolia*. Los 6 periodos en que fueron recolectados corresponden a: I (Enero-Febrero), II (Marzo-Abril), III (Mayo-Junio), IV (Julio-Agosto), V (Septiembre-Octubre), VI (Noviembre-Diciembre).

Tabla C.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos A2 y A3.

COMPUESTOS	I.K.	GENOTIPO A2						GENOTIPO A3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
triciclono	930	0,3	0,2	-	-	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-
$\alpha$ -tuyeno	932	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	-
$\alpha$ -pineno	943	10,2	12,1	23,6	8,6	10,7	9,3	7,8	9,9	19,8	6,8	7,6	1,8
canfeno	962	2,1	2,4	2,1	2,9	2,4	2,3	4,5	4,0	2,7	4,1	4,0	0,9
octen-3-ol	978	0,3	0,1	0,1	-	-	-	0,2	0,3	0,1	-	-	-
sabineno	981	0,1	0,3	0,5	0,4	0,3	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
$\beta$ -pineno + mirceno	991	18,1	18,1	22,4	17,3	18,1	20,0	11,8	15,0	11,2	9,6	14,3	6,7
$\alpha$ -felandreno	1025	0,2	0,3	0,8	0,3	-	-	0,2	0,2	0,3	0,2	-	-
$\delta$ -3-careno	1012	-	-	-	-	5,5	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -terpineno	1025	-	-	-	-	0,2	0,2	-	-	-	-	0,1	-
<i>p</i> -cimeno	1033	2,0	1,4	3,1	0,8	0,9	1,8	0,8	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
limoneno	1038	4,6	4,8	4,5	5,6	4,0	5,4	18,0	17,1	25,1	15,4	19,3	13,2
1,8-cineol	1044	37,9	24,5	13,3	24,5	25,2	18,3	25,5	17,7	18,4	11,6	16,1	5,7
$\gamma$ -terpineno	1066	0,7	1,8	6,2	2,0	1,6	1,4	0,3	0,3	0,6	0,4	0,3	0,4
<i>cis</i> -sabineno hidrato	1079	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,3	0,3	0,3	0,6	0,6	0,4
terpinoleno	1094	0,2	0,3	0,5	0,7	0,4	0,4	0,1	0,2	0,2	0,5	0,3	0,3
linalol	1102	-	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	-
<i>allo</i> -ocimeno	1111	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	-
alcanfor	1165	11,9	14,8	12,7	21,9	16,8	19,7	7,8	6,0	4,8	17,1	10,3	7,9
óxido de $\beta$ -pineno	1182	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
borneol	1187	1,5	2,1	1,6	1,5	1,6	3,4	3,7	3,5	2,3	4,6	4,0	4,8

## ANEXO I.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

COMPUESTOS	I.K.	GENOTIPO A2						GENOTIPO A3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
terpinen-4-ol	1193	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,7	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3
$\alpha$ -terpineol	1206	0,2	0,2	0,3	0,2	-	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3
mirtenol	1213	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-
<i>trans</i> -carveol	1230	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,5	0,3	0,2	0,5	0,4	0,4
nerol	1245	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	-
geraniol	1250	-	-	-	0,2	-	0,3	-	-	-	-	-	0,2
acetato de linalilo	1254	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,2	0,1	-
geranial	1274	0,1	0,1	0,1	2,5	0,1	0,5	0,1	-	-	0,1	0,1	-
acetato de bornilo	1296	0,2	1,4	0,4	-	1,2	0,1	0,1	1,0	0,6	5,1	2,2	1,3
acetato de terpinen-4-ol	1322	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,4
acetato de $\alpha$ -terpenil	1355	-	-	-	-	-	0,1	0,5	0,2	0,2	-	0,2	-
$\alpha$ -cubebeno	1359	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	0,3	0,1	0,4
acetato de geranilo	1381	-	-	-	0,1	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-
$\alpha$ -copaeno	1392	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,1	-
$\beta$ -cubebeno	1405	0,1	-	-	-	-	0,3	0,2	-	-	-	-	-
$\beta$ -gurjuneno	1427	-	0,3	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
$\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoteno	1438	-	-	-	-	-	-	0,4	-	0,1	-	0,1	-
<i>trans</i> -cariofileno	1441	0,6	1,5	1,4	1,3	0,9	1,2	4,8	10,3	7,4	11,9	9,9	24,0
$\alpha$ -bergamoteno	1445	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
(Z)- $\beta$ -farneseno	1451	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -humuleno	1469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -farneseno	1477	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,6	0,4	0,6	0,5	1,3
<i>ar</i> -curcumeno	1491	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,4	0,6	0,3	0,4	0,4	1,8
valenceno	1501	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-
$\gamma$ -muroleno	1510	-	-	0,1	-	0,1	0,2	-	-	0,1	-	0,1	0,4
biciclogermacreno	1514	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,2	0,1	0,1	-	-
$\alpha$ -zingibereno	1519	0,1	0,3	0,1	0,1	-	-	-	-	0,2	-	0,1	0,3
cubebol	1534	0,4	0,7	0,4	0,5	0,4	0,7	0,2	0,8	0,4	0,4	0,5	1,8
$\delta$ -cadineno	1539	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,6	0,1	-	-	-	0,1	0,3
$\beta$ -bisaboleno	1555	0,4	0,3	0,3	0,7	0,4	0,4	-	0,1	-	0,1	0,1	-
$\beta$ -sesquifelandreno	1566	-	-	-	-	-	0,9	-	0,1	-	0,1	0,1	0,4
germacreno D	1598	0,2	-	0,2	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
espatulenol	1600	0,1	1,0	-	0,1	0,1	0,2	-	0,2	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1609	0,5	0,4	0,3	0,1	0,2	0,6	2,3	1,7	0,8	1,6	1,9	9,7
viridiflorol	1621	0,1	0,1	-	-	0,1	0,2	0,1	0,1	-	-	-	0,4

ANEXO I.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

COMPUESTOS	I.K.	GENOTIPO A2						GENOTIPO A3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
cubenol	1658	-	-	-	-	-	0,2	-	0,2	0,1	0,1	-	0,4
vulgarona B	1663	-	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,9
$\beta$ -eudesmol	1682	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -eudesmol	1686	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,2	-	-	-	0,2	0,2	-
$\alpha$ -cadinol	1709	0,1	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
<b>% Total identificado</b>		<b>96,1</b>	<b>93,3</b>	<b>97,6</b>	<b>95,7</b>	<b>95,2</b>	<b>93,4</b>	<b>93,4</b>	<b>93,2</b>	<b>98,1</b>	<b>94,5</b>	<b>95,7</b>	<b>88,0</b>
Monoterpenos hidrocarbonados		38,3	40,1	57,7	36,4	42,6	40,1	43,7	47,2	59,9	36,7	46,0	23,1
Monoterpenos oxigenados		55,3	47,5	37,1	55,9	49,1	47,8	41,5	31,3	28,7	42,5	36,2	23,2
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>93,6</b>	<b>87,6</b>	<b>94,8</b>	<b>92,3</b>	<b>91,7</b>	<b>87,9</b>	<b>85,2</b>	<b>78,5</b>	<b>88,6</b>	<b>79,2</b>	<b>82,2</b>	<b>46,3</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		2,2	4,0	3,0	3,5	2,9	3,7	5,7	12,8	9,0	13,8	11,8	30,3
Sesquiterpenos oxigenados		1,0	2,0	0,5	0,4	0,7	1,8	2,7	2,4	1,0	2,1	2,3	11,4
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>3,2</b>	<b>6,0</b>	<b>3,5</b>	<b>3,9</b>	<b>3,6</b>	<b>5,5</b>	<b>8,4</b>	<b>15,2</b>	<b>10,0</b>	<b>15,9</b>	<b>14,1</b>	<b>41,7</b>



Tabla D.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos B1, B2 y B3.

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO B1						GENOTIPO B2						GENOTIPO B3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
tricicleno	930	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -tuyeno	932	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1
$\alpha$ -pineno	943	6,0	6,9	11,4	5,0	6,8	7,2	5,9	4,4	9,6	6,0	6,3	6,4	3,5	2,4	3,8	2,6	5,5	2,8
canfeno	962	1,5	1,8	1,2	2,1	2,1	2,1	1,6	1,1	1,6	2,4	1,8	2,1	0,6	0,9	0,5	0,9	1,7	0,7
octen-3-ol	978	3,3	-	-	-	-	-	3,4	0,1	-	-	-	-	4,4	0,1	0,2	-	-	-
sabineno	981	-	2,4	3,2	2,9	3,1	3,0	-	1,6	3,1	3	2,9	2,9	0,1	2,2	3,6	3,6	3,2	3,3
$\beta$ -pineno + mirceno	991	10,6	16,8	21,1	11,8	14,0	13,8	11,6	12,5	18,5	14,2	14,0	13,7	11,9	15,2	25,0	11,7	14,5	12,0
$\alpha$ -felandreno	1025	-	0,1	0,1	-	-	2,0	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<i>p</i> -cimeno	1033	0,7	0,6	0,4	0,3	0,4	0,5	0,8	0,4	0,3	0,3	0,4	0,6	0,3	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2
limoneno	1038	2,2	2,6	2,6	2,7	2,6	2,6	2,4	1,8	2,6	2,6	2,5	2,6	4,4	5,5	4,8	5,4	4,4	5,7
1,8-cineol	1044	53,1	16,8	38,2	42,7	46,7	43,7	47,9	17,5	41,0	43,2	44,3	42,7	51,8	27,8	43,3	49,4	48,8	57,0
$\gamma$ -terpineno	1066	0,4	0,8	1,8	0,6	0,8	0,7	0,4	0,7	1,3	0,6	0,8	0,7	0,3	1,0	2,3	0,3	0,9	0,3
cis-sabineno hidrato	1079	0,9	0,4	0,6	0,9	0,8	0,8	0,8	0,6	0,5	0,8	0,8	0,8	0,9	0,5	0,7	1,0	0,8	0,9
terpinoleno	1094	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
linalol	1102	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	-	0,2	0,1	0,3
<i>allo</i> -ocimeno	1111	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
alcanfor	1165	2,3	3,3	2,7	7,8	5,5	4,3	2,4	4,6	4,1	7,2	5,2	5,6	1,2	4,0	1,4	4,7	4,7	2,7
óxido de $\beta$ -pineno	1182	0,9	0,5	0,4	0,8	0,8	0,7	1,0	0,7	0,6	0,7	0,8	0,8	1,1	0,4	-	1	0,8	0,8
borneol	1187	1,6	2,0	1,2	2,6	1,9	1,9	1,7	2,8	1,5	2,0	2,0	2,3	0,4	1,3	0,4	0,7	1,5	0,4
terpinen-4-ol	1193	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3
$\alpha$ -terpineol	1206	0,9	0,6	0,6	1,1	1,1	0,9	1	0,9	0,8	0,9	1,1	1,0	1,2	0,5	0,6	1,4	1,0	0,8
mirtenol	1213	0,2	0,2	-	0,1	-	0,1	0,3	0,2	-	0,1	-	0,1	0,3	0,1		0,1	-	0,1
<i>trans</i> -carveol	1230	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO B1						GENOTIPO B2						GENOTIPO B3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
nerol	1245	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-	0,1	0,1
geraniol	1250	-	-	-	-	-	0,6	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
acetato de linalilo	1254	0,4	0,3	0,3	0,6	0,6	0,1	0,5	0,4	0,3	0,5	0,6	0,6	0,4	0,3	0,2	0,7	0,5	0,1
geranial	1274	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-
acetato de bornilo	1296	-	0,7	0,3	1,3	0,5	0,1	-	1,0	0,4	1,0	0,3	0,1	-	0,8	-	0,2	0,3	-
acetato de terpinen-4-ol	1355	0,2	0,1	-	-	-	0,5	0,2	0,1	-	-	-	0,1	0,2	0,1	-	-	-	0,1
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1359	1,4	0,9	0,4	0,7	0,4	0,1	1,7	0,8	0,3	0,5	0,4	0,5	1,6	0,4	0,2	0,3	0,5	-
$\alpha$ -cubebeno	1364	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	0,1	-
acetato de geranilo	1381	0,1	0,4	-	-	-	0,1	0,1	0,5	-	-	-	0,1	-	0,1	-	-	-	-
$\beta$ -cubebeno	1392	0,1	-	0,2	0,1	-	-	0,1	-	0,2	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -copaeno	1405	-	0,1	0,1	0,5	0,3	-	-	0,2	0,2	0,4	0,2	-	-	0,2	-	0,2	0,2	-
iso-longifoleno	1406	-	0,3	0,1	-	0,1	-	-	0,3	0,1	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-
$\beta$ -elemeno	1412	-	0,5	0,1	-	0,1	-	-	0,6	0,1	-	0,1	-	-	0,3	-	-	0,1	-
$\beta$ -gurjuneno	1427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -trans-bergamoteno	1438	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,4	-	-	-
trans-cariofileno	1441	0,6	4,7	1,6	1,6	1,0	0,9	0,7	5,9	1,7	1,4	1,2	1,2	1,6	11,6	2,9	6,0	2,0	2,7
$\alpha$ -bergamoteno	1445	0,1	0,2	-	0,1	-	0,1	0,1	0,3	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1
(Z)- $\beta$ -farneseno	1451	0,1	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	-
$\alpha$ -humuleno	1469	-	0,1	0,1	0,2	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,4	0,1	-
(E)- $\beta$ -farneseno	1477	0,1	0,6	0,2	0,2	0,1	-	0,1	0,7	0,2	0,2	0,2	-	0,3	2,1	0,8	1,3	0,3	0,7
allo-aromadendreno	1481	-	0,1	-	-	-	0,2	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
ar-curcumeno	1491	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
valenceno	1501	-	0,8	0,1	0,1	-	-	-	1,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	1,5	0,1	0,1	0,2	-
$\gamma$ -muuroleno	1508	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1
biciclogermacreno	1514	-	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,7	0,2	0,1	0,1	-	-	0,2	0,1	-	0,1	-

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO B1						GENOTIPO B2						GENOTIPO B3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
$\alpha$ -zingiberene	1519	0,1	0,3	-	0,2	-	-	0,1	0,4	-	0,1	-	1,6	-	0,2	-	-	-	-
cubebol	1534	1,1	4,2	1,1	1,1	1,1	1,3	1,2	4,6	1,0	0,9	1,4	-	-	1,0	0,1	-	0,6	-
$\delta$ -cadineno	1539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -bisaboleno	1555	1,5	4,8	1,8	2,6	2,0	0,2	1,6	5,1	1,8	2,2	2,4	0,1	0,8	1,7	0,7	1,5	1,4	1,3
$\beta$ -sesquifelandreno	1566	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	1,9	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	0,3	-	-	-
germacreno D	1598	0,2	-	0,3	-	0,2	0,1	0,2	-	0,2	-	0,2	-	0,4	-	-	-	0,1	0,2
espatulenol	1600	0,1	1,1	-	0,1	-	0,1	0,1	1,3	-	-	0,1	0,1	-	0,9	-	-	-	-
óxido de cariofileno	1605	1,3	2,8	0,6	0,6	0,4	0,9	1,7	3,1	0,6	0,5	0,8	0,9	5,3	2,8	1,1	2,2	0,9	2,5
viridiflorol	1609	3,9	13,3	3,0	4,9	3,6	4,3	4,8	13,9	3,7	4,1	4,8	5,3	0,1	2,9	-	-	2,0	0,1
cubenol	1654	0,1	0,2	-	-	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	0,6	0,3	0,1	-	-	-
vulgarona B	1658	0,3	0,6	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,9	0,1	0,1	0,2	0,2	1,2	0,6	0,2	0,4	0,2	0,6
$\beta$ -eudesmol	1663	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	-	0,1	-	0,1
$\alpha$ -eudesmol	1686	0,1	0,3	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-
$\alpha$ -cadinol	1709	-	0,1	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
tiglato de geranilo	1740	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>% Total identificado</b>		<b>97,7</b>	<b>95,7</b>	<b>97,8</b>	<b>98,3</b>	<b>98,8</b>	<b>98,0</b>	<b>96,6</b>	<b>95,2</b>	<b>98,8</b>	<b>97,9</b>	<b>97,7</b>	<b>97,6</b>	<b>96,7</b>	<b>92,7</b>	<b>95,7</b>	<b>97,7</b>	<b>99,1</b>	<b>97,8</b>
Monoterpenes hidrocarbonados		24,5	31,4	40,4	25,1	29,2	31,5	26,1	22,2	36,2	28,8	28,1	28,6	25,5	26,7	38,8	24,6	30,0	25,0
Monoterpenes oxigenados		63,4	29,0	47,9	61,0	60,6	55,8	59,1	33,5	52,5	58,9	57,7	56,7	60,5	39,4	50,2	60,8	61,0	64,7
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>87,9</b>	<b>60,4</b>	<b>88,3</b>	<b>86,1</b>	<b>89,8</b>	<b>87,3</b>	<b>85,2</b>	<b>55,7</b>	<b>88,7</b>	<b>87,7</b>	<b>85,8</b>	<b>85,3</b>	<b>86</b>	<b>66,1</b>	<b>89,0</b>	<b>85,4</b>	<b>91,0</b>	<b>89,7</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		4,0	16,9	5,7	6,5	4,8	5,1	4,3	19,6	5,6	5,5	5,9	6,0	3,3	18,8	5,2	9,6	4,9	5,1
Sesquiterpenos oxigenados		5,8	18,4	3,8	5,7	4,2	5,6	7,1	20,0	4,5	4,7	6,0	6,6	7,4	7,8	1,5	2,7	3,2	3,3
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>9,8</b>	<b>35,3</b>	<b>9,5</b>	<b>12,2</b>	<b>9,0</b>	<b>10,7</b>	<b>11,4</b>	<b>39,6</b>	<b>10,1</b>	<b>10,2</b>	<b>11,9</b>	<b>12,6</b>	<b>10,7</b>	<b>26,6</b>	<b>6,7</b>	<b>12,3</b>	<b>8,1</b>	<b>8,4</b>

Tabla E.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos C1, C2 y C3.

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO C1						GENOTIPO C2						GENOTIPO C3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
tricicleno	930	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -tuyeno	932	0,1	-	0,4	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,4	-	0,2	0,1	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,2
$\alpha$ -pineno	943	4,2	1,3	12,6	3,8	4,8	4,6	1,9	1,9	2,7	1,1	1,9	5,2	8,7	9,3	9,2	8,2	7,6	9,4
canfeno	962	3,2	1	3	4,3	3,9	3,1	3,6	2,4	2,4	2,2	4,4	4,4	0,6	0,8	0,6	1,2	0,8	1,0
octen-3-ol	978	1,9	0,1	0,1	-	-	0,1	1,2	-	-	-	-		4,8	-	-	-	-	
sabineno	981	0,1	0,6	1,9	1,9	2,5	2,3	-	1,3	1,9	0,9	1,2	1,0	-	2,2	3,1	4	3,7	3,7
$\beta$ -pineno + mirceno	991	9,6	6,4	22,3	9,7	9,8	11,1	8,8	15,4	22,2	8,6	13,7	31,1	13,1	12,3	13,6	13,9	12,0	13,1
$\alpha$ -felandreno	1025	-	-	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	0,2	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>p</i> -cimeno	1033	0,5	0,4	0,8	0,3	0,2	0,3	1,1	0,5	1	0,3	0,5	0,5	0,8	0,4	0,5	0,3	0,3	0,5
limoneno	1038	6,2	3,9	5,3	7,4	5,9	6,2	9	7,4	15,2	9,6	10,2	7,8	7,9	7,2	9,1	8,7	6,4	6,9
1,8-cineol	1044	29,6	13,8	17,3	24,9	38,6	31,6	24,2	18,2	11,3	8,2	15,6	15,0	54,1	31,3	40,6	42,1	56,2	52,1
$\gamma$ -terpineno	1066	0,6	0,7	1,8	0,7	0,5	0,4	0,6	1,2	4	1,2	1,2	0,6	0,7	1	1,7	0,9	0,8	0,8
cis-sabineno hidrato	1079	0,7	0,6	0,5	0,6	0,7	0,4	0,6	0,4	0,6	0,3	0,5	0,4	0,6	0,4	0,8	0,8	0,8	0,8
terpinoleno	1094	0,2	0,2	0,4	0,6	0,3	0,2	0,1	0,3	0,4	0,9	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
linalol	1102	0,5	1,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4	0,1	0,3	0,5	0,3	0,2	0,3
<i>allo</i> -ocimeno	1111	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
alcanfor	1165	13	13	12,2	16,6	13,7	11,1	24,4	14,7	19,9	15,1	26,4	28,7	0,5	1,1	1,5	2,8	1,4	1,5
óxido de $\beta$ -pineno	1182	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,2	-	-	-	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2
borneol	1187	4,7	6,9	4,5	6,3	4,3	4,3	4,8	3,5	3,1	4	5,3	7,7	0,8	1,6	1,4	2,7	1,5	1,7
terpinen-4-ol	1193	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,6	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
$\alpha$ -terpineol	1206	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,1	0,3	0,1	-	-	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1
mirtenol	1213	0,1	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1	0,1		-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1
<i>trans</i> -carveol	1230	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO C1						GENOTIPO C2						GENOTIPO C3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
nerol	1245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
geraniol	1250	-	0,6	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	0,4	-	-	0,5
acetato de linalilo	1254	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1	0,6	0,3	-	0,7	0,6	0,1
geranial	1274	0,1	0,1	-	0,1	0,9	0,5	0,1	0,1	-	-	0,1	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
acetato de bornilo	1296	0,1	1,7	1,3	3,7	0,2	0,1	0,1	2,1	0,7	5,9	1,5		-	0,9	0,8	0,5	0,3	
acetato de terpinen-4-ol	1355	0,3	0,3	-	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-		-	-	-	-	-	
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1359	2,4	2,6	0,7	1,8	2,1	2,2	0,2	0,2	0,1	0,2	-		-	-	-	-	-	
$\beta$ -cubebeno	1405	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-		-	-	-	-	-	
acetato de geranilo	1381	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1		-	0,1	0,1	0,1	-	
$\alpha$ -copaeno	1392	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	0,1
$\beta$ -elemeno	1412	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-		-	0,2	0,1	-	0,1	
$\beta$ -gurjuneno	1427	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,4	0,2	-	-	0,1
$\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoteno	1438	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	
<i>trans</i> -cariofileno	1441	2	8	3,7	4	2,3	2,8	2,8	12,3	5,4	19,9	6,2	2,7	0,4	3,1	3,1	1,7	0,7	0,7
$\alpha$ -bergamoteno	1445	0,1	0,2	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	0,3	-	0,1	-	-	-	-	-	
(Z)- $\beta$ -farneseno	1451	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	-	0,1	-	-	-	-		
$\alpha$ -humuleno	1469		-	-	0,1	-	0,2		0,1	-	0,5	0,1			0,2	0,5	0,4	0,3	0,1
(E)- $\beta$ -farneseno	1477	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,3	0,5	2,3	0,6	3,6	1,3		0,2	1,1	0,7	0,9	0,3	0,3
<i>allo</i> -aromadendreno	1481	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	0,1
<i>ar</i> -curcumeno	1491	0,4	0,8	0,2	0,3	0,2	-	-	0,1	-	-	-		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
valenceno	1501	-	0,8	0,1	-	0,1	-	-	0,7	-	-	-		-	0,2	0,1	-	-	0,1
$\gamma$ -muuroleno	1508	0,1	-	-	0,1	-	0,2	0,1		0,1	0,4	-	0,1	0,1	-	0,2	0,2	-	0,1
biciclogermacreno	1514	0,5	-	1,8	-	1,1	0,4	-	0,1	0,2	-	0,2		-	0,1	0,2	-	-	0,1
$\alpha$ -zingibereno	1519	-	7,9	-	2,6	0,4	0,1	0,2	0,1	-	0,6	-	0,1	-	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3
cubebol	1534	-	0,2	-	-	-	0,3	-	0,6	0,1	0,2	0,1	0,2	-	0,4	0,1	0,1	0,2	0,2
$\delta$ -cadineno	1539	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,6	0,3	0,5	0,3	

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO C1						GENOTIPO C2						GENOTIPO C3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
β-bisaboleno	1555	1,2	1,9	0,7	1,2	-	0,4	1,7	2,1	1,6	5,2	2,6	1,8	-	-	0,2	-	-	
β-sesquifelandreno	1566	0,1	0,1	-	0,1	-	-	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	
germacreno D	1598	-	-	-		-	-	0,2	-	0,3	-	0,1	0,1	0,2	-	0,7		0,6	0,4
espatulenol	1600	3,8	6,7	2,7	2,4	1,6	2,9	0,3	0,2	-	0,1	-	0,2	0,3	0,6	0,3	0,4	0,2	0,3
óxido de cariofileno	1605	2,5	4,9	1,8	1,4	-	1,6	5,4	3,9	2,6	4,1	2,7	2,6	0,8	1,3	0,9	0,6	0,5	0,7
viridiflorol	1609	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	1,7	-	-	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1
cubenol	1654	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,4	0,3	0,1	-	-		-	0,3	0,2	0,1	-	
vulgarona B	1658	0,3	1,4	0,2	0,1	0,1	0,3	0,8	0,7	0,3	0,4	0,3	0,4	0,2	0,6	0,3	0,1	0,1	0,2
β-eudesmol	1663	0,3	0,5	-	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,3	0,1	0,1	-	0,4	0,1	-	-	
α-eudesmol	1686	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,6	0,1	-	-	
α-cadinol	1709	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	
tiglato de geranilo	1740	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,7	-	-	-	0,5
manool	2084	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,7	0,1	-	-	0,1
<b>% Total identificado</b>		<b>92,0</b>	<b>92,1</b>	<b>98,6</b>	<b>98,0</b>	<b>96,4</b>	<b>91,2</b>	<b>95,3</b>	<b>97,3</b>	<b>98,6</b>	<b>95,6</b>	<b>98,3</b>	<b>96,7</b>	<b>97,8</b>	<b>83,7</b>	<b>94,5</b>	<b>94,4</b>	<b>97,8</b>	<b>98,4</b>
Monoterpenes hidrocarbonados		25,9	13,7	46,5	27,7	27,5	28,3	25,8	29,3	46,0	22,8	32,3	32,2	36,3	32,6	36,5	36,7	31,2	35,0
Monoterpenes oxigenados		54,3	43,5	40,5	57,3	62,8	52,8	56,5	42,3	41,1	36,8	52	55,0	58,9	38,9	49,5	52,2	63,1	59,1
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>80,2</b>	<b>57,2</b>	<b>87,0</b>	<b>85,0</b>	<b>90,3</b>	<b>81,1</b>	<b>82,3</b>	<b>71,6</b>	<b>87,1</b>	<b>59,6</b>	<b>84,3</b>	<b>87,2</b>	<b>95,2</b>	<b>71,5</b>	<b>86,0</b>	<b>88,9</b>	<b>94,3</b>	<b>59,1</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		4,6	20,7	6,7	8,8	4,2	5,0	5,8	18,6	8,4	31,1	10,7	6,3	1,1	5,9	6,4	4,2	2,6	2,4
Sesquiterpenos oxigenados		7,2	14,2	4,9	4,2	1,9	5,1	7,2	7,1	3,1	4,9	3,3	3,8	1,5	6,3	2,1	1,3	0,9	1,9
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>11,8</b>	<b>34,9</b>	<b>11,6</b>	<b>13,0</b>	<b>6,1</b>	<b>10,1</b>	<b>13,0</b>	<b>25,7</b>	<b>11,5</b>	<b>36,0</b>	<b>14,0</b>	<b>10,1</b>	<b>2,6</b>	<b>12,2</b>	<b>8,5</b>	<b>5,5</b>	<b>3,5</b>	<b>4,3</b>

Tabla F.- Seguimiento anual en la composición química de los aceites esenciales de los genotipos D1, D2 y D3.

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO D1						GENOTIPO D2						GENOTIPO D3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
tricicleno	930	0,1	-	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2
$\alpha$ -tuyeno	932	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	-	0,1	0,2	0,2
$\alpha$ -pineno	943	4	3,3	3,4	3,2	3,4	3,2	4,4	6,6	10,1	4,7	4,9	5,5	12,8	14,8	3,5	5,2	8,1	9,9
canfeno	962	0,9	1,2	1,1	2,1	1,4	1,7	0,8	0,5	1,6	1,5	0,8	0,8	0,2	0,4	0,2	0,6	0,6	0,7
octen-3-ol	978	4,2	0,1	-	-	-	-	2,6	-	-	-	-	-	3,2	-	0,1	-	-	-
sabineno	981	-	3,3	3,7	3,8	3,9	3,8	-	1,7	2,9	2,6	2,1	2,2	0,1	1,9	4,1	4,1	3,4	3,6
$\beta$ -pineno + mirceno	991	10,5	13,4	13	10,6	10,5	10,5	15	27,7	21,5	18,7	23,4	23,4	15	22,7	19	14,2	16,9	18,1
$\alpha$ -felandreno	1025	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,7	0,1	0,1	0,1	0,1	1	0,1
<i>p</i> -cimeno	1033	0,7	0,5	0,4	0,4	0,5	0,7	1,2	0,8	0,6	0,4	0,8	1,3	1,3	0,9	0,4	0,2	0,5	1,0
limoneno	1038	3,2	4,6	4,8	4,5	4,3	4,5	4,8	3,7	4,7	4,8	5,2	5,3	2,9	3,8	5,4	5,0	5,0	5,3
1,8-cineol	1044	62,7	48,8	52,5	49,1	56,8	54,3	46,0	22,0	24,3	34,4	37,2	31,2	49,5	10,8	49,2	50,6	47,5	43,0
$\gamma$ -terpineno	1066	0,6	1,2	1,6	0,9	1	0,9	0,9	1,8	2,2	1,4	1,9	1,7	0,9	2,4	1	0,7	1,4	1,4
cis-sabineno hidrato	1079	0,7	0,8	1,1	1,3	1,3	1,1	0,8	0,4	0,5	0,8	0,7	0,6	0,5	0,3	0,6	0,8	0,7	0,6
terpinoleno	1094	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
linalol	1102	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,8	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5
<i>allo</i> -ocimeno	1111	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
alcanfor	1165	2,5	4,7	6	11,4	6,8	8,2	2,8	2,7	2,8	7,8	4,8	3,8	0,7	2,3	0,6	3,3	2,9	2,1
óxido de $\beta$ -pineno	1182	0,8	0,4	0,5	0,7	0,6	0,5	0,7	0,2	0,5	0,5	0,3	0,3	0,8	0,3	0,5	0,6	0,4	0,3
borneol	1187	0,7	1,1	1	2	1,3	1,6	0,9	0,8	2,1	2,1	0,7	0,6	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2
terpinen-4-ol	1193	0,8	0,6	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
$\alpha$ -terpineol	1206	1,3	0,5	0,9	1,2	0,7	0,5	1,8	0,3	1,2	1,4	0,6	0,5	0,9	0,3	0,4	0,5	0,2	0,2
mirtenol	1213	0,2	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1
<i>trans</i> -carveol	1230	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO D1						GENOTIPO D2						GENOTIPO D3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
nerol	1245	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,1
acetato de linalilo	1254	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,5	0,5	0,4
geranial	1274	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1
acetato de bornilo	1296	-	0,6	0,4	0,5	0,1	-	-	0,1	0,6	0,8	0,1		-	0,1	-	0,1	-	-
acetato de terpinen-4-ol	1355	0,1	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-		0,1	-	-	-	-	-
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1359	0,4	0,2	0,1	-	0,2	0,1	0,1	-	0,2	-	-		-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -cubebeno	1359	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	0,2	0,2	0,1	-
acetato de geranilo	1381	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-	-	0,1	-		-	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
$\alpha$ -copaeno	1392	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1	-	0,1	0,1
$\beta$ -cubebeno	1405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0,1	-	-	-	-	0,1
$\beta$ -elemeno	1412	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,2	-	0,1		-	0,3	0,2	-	0,1	-
<i>trans</i> -cariofileno	1441	1,2	7,4	4,2	2,6	2,2	2,5	2,7	11,8	7,6	7,4	5,2	5,5	1,4	12,7	4,1	5	3,1	2,6
$\alpha$ -humuleno	1469	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,3	0,2		-	-	0,1	0,2	0,1	-
( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1477	0,2	0,6	0,4	0,3	0,3	-	0,7	2,2	2,8	1,8	1,1	1,1	0,2	2,1	1,3	1,5	1	-
<i>ar</i> -curcumeno	1491	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	-	-		0,2	0,6	0,1	0,2	0,2	-
valenceno	1501	-	0,2	-	-	-	0,3	-	2,7	0,6	0,3	0,2	0,2	0,1	3,3	0,1	0,2	0,3	0,8
$\gamma$ -muurolene	1508	-		0,1	0,1	-	0,1	0,1		0,1	0,1	-		0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,2
biciclogermacreno	1514	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,2	-		-	-	0,3	0,1	-	0,2
$\alpha$ -zingibereno	1519	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-		-	-	0,2	-	0,1	0,1
cubebol	1534	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,3	-	0,1	0,1	0,1	-	1,5	0,9	0,6	0,7
$\delta$ -cadineno	1539	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-		-	-	-	-	-	-
$\beta$ -bisaboleno	1555	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,6	0,1	-		-	-	0,1	-	-	-
$\beta$ -sesquifelandreno	1566	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	0,2	-	-	-
germacreno D	1598	0,2	-	0,2	-	0,2	0,2	0,2	-	0,6	-	0,2	0,2	0,1	-	-	-	0,1	0,2
espatulenol	1600	-	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-		-	0,2	-	-	-	-



COMPUESTOS	I.K	GENOTIPO D1						GENOTIPO D2						GENOTIPO D3					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
óxido de cariofileno	1605	1,4	2,0	1,5	1,3	1,2	1,6	5	3,5	4,1	2,7	3,0	4,9	2,7	4,3	2,3	1,5	1,6	2,5
viridiflorol	1609	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cubenol	1654	0,2	0,2	0,1	-	-	-	0,4	0,3	0,3	0,2	-	-	0,2	-	0,2	0,1	-	-
vulgarona B	1658	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4	0,7	0,5	0,4	0,3	0,4	0,7	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4
β-eudesmol	1663	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
α-eudesmol	1686	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
α-cadinol	1709	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tiglato de geranilo	1740	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manool	2084	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-	0,4	0,5
<b>% Total identificado</b>		<b>99,4</b>	<b>97,8</b>	<b>99,6</b>	<b>99,1</b>	<b>99,1</b>	<b>98,6</b>	<b>95,2</b>	<b>93,6</b>	<b>96,8</b>	<b>97,7</b>	<b>96,4</b>	<b>95,0</b>	<b>97,0</b>	<b>87,1</b>	<b>98,2</b>	<b>98,5</b>	<b>98,9</b>	<b>97,0</b>
Monoterpenes hidrocarbonados		23,9	26,8	26,8	25,0	24,3	24,7	29,3	41,4	41,9	33,1	37,8	41,7	36,0	44,9	33,1	29,6	35,8	39,1
Monoterpenes oxigenados		71,9	60,0	65,8	69,4	70,4	68,9	55,7	29,9	36,0	51,0	48,1	40,9	55,3	18,7	54,2	58,8	55,2	49,8
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>95,8</b>	<b>86,8</b>	<b>92,6</b>	<b>94,4</b>	<b>94,7</b>	<b>93,6</b>	<b>85,0</b>	<b>71,3</b>	<b>77,9</b>	<b>84,1</b>	<b>85,9</b>	<b>82,6</b>	<b>91,3</b>	<b>63,6</b>	<b>87,3</b>	<b>88,4</b>	<b>91,0</b>	<b>88,9</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		1,7	8,3	5,1	3,2	2,9	3,1	3,8	17,3	13,2	10,2	7,0	7,1	2,2	18,7	8,1	8,2	5,6	4,9
Sesquiterpenos oxigenados		1,9	2,6	1,8	1,5	1,5	2,0	6,3	4,9	5,6	3,3	3,5	5,7	3,5	4,8	2,8	1,9	2,3	3,5
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>3,6</b>	<b>10,9</b>	<b>6,9</b>	<b>4,7</b>	<b>4,4</b>	<b>5,1</b>	<b>10,1</b>	<b>22,2</b>	<b>18,8</b>	<b>13,5</b>	<b>10,5</b>	<b>12,8</b>	<b>5,7</b>	<b>23,5</b>	<b>10,9</b>	<b>10,1</b>	<b>7,9</b>	<b>8,4</b>

### VII.2.2. Campaña 2011

\* Los genotipos A3 y C1 no se recolectaron durante el año 2011 debido a la escasez de material vegetal. La recolección en este año se realizó en los meses de Junio (floración) y Octubre (maduración de las semillas).

Tabla G.- Composición química de los genotipos evaluados durante el año 2011.

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPOS																	
		A2		B1		B2		B3		C2		C3		D1		D2		D3	
		III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V
$\alpha$ -tuyeno	932	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2
$\alpha$ -pineno	943	34,3	22,5	10,5	6,2	8,7	5,8	2,5	2,8	1,5	2,1	5,7	6,9	3,9	5,6	5,2	6,3	14,5	8,2
canfeno	962	4,9	5,6	1,2	2,8	1,4	1,4	0,7	0,2	1,6	3,7	0,6	0,5	1,4	0,7	0,5	2,0	0,4	0,2
sabineno	981	0,1	0,3	3,0	2,8	3,0	3,3	2,4	3,7	1,4	1,2	3,4	3,6	4,4	3,5	2,2	3,5	2,9	4,0
$\beta$ -pineno + mirceno	991	10,4	16,0	20,3	11,3	18,5	10,6	11,8	8,9	12,4	8,8	17,0	10,3	15,6	9,9	17,1	10,9	20,7	13,9
<i>p</i> -cimeno	1033	1,3	0,2	0,3	0,5	0,2	0,6	0,2	0,2	0,8	0,7	0,4	0,6	0,4	0,6	0,7	0,1	0,6	0,4
limoneno	1038	4,1	4,2	2,5	2,4	2,5	2,0	4,0	3,0	8,7	7,8	7,1	5,7	6,0	3,0	5,7	2,5	4,4	3,0
1,8-Cineol	1044	1,9	12,3	35,9	54,1	34,5	54,7	33,5	69,5	18,8	22,8	39,4	64,2	40,1	63,8	40,0	55,4	34,2	59,2
$\gamma$ -terpineno	1066	3,0	2,3	1,8	0,4	1,3	0,3	1,3	0,2	3,3	0,6	2,0	0,5	1,7	0,8	2,1	0,1	2,8	0,7
cis-sabineno hidrato	1079	0,1	0,5	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,9	1,1	0,7	0,7	0,7	1,1	0,8	0,8	0,8	0,6	0,7
terpinoleno	1094	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
linalol	1102	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2
octen-1-ol-acetato	1110	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1
alcanfor	1165	7,1	9,3	3,1	5,7	4,3	2,9	2,0	0,8	13,7	28,0	1,9	0,7	5,7	3,0	2,8	1,8	2,1	0,7
borneol	1187	2,5	2,2	1,4	1,8	1,7	1,6	1,0	-	0,2	4,6	0,6	0,8	1,1	0,4	0,5	2,5	0,2	0,1
terpinen-4-ol	1193	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,5	0,4	0,2	0,5	0,3	0,7	0,3	0,3	0,2	0,3

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPOS																	
		A2		B1		B2		B3		C2		C3		D1		D2		D3	
		III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V
$\alpha$ -terpineol	1066	0,3	0,2	0,6	0,1	0,7	1,2	0,1	1,5	0,2	0,1	0,4	0,1	0,1	1,6	1,7	2,8	0,3	0,6
mirtenol	1213	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
acetato de linalilo	1254	0,1	0,6	0,2	0,5	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,4
acetato de bornilo	1296	1,6	0,3	0,7	0,4	0,8	0,2	0,4	-	1,8	0,8	0,4	0,1	0,6	0,1	0,2	0,4	0,1	-
$\alpha$ -cubebeno	1364	0,1	0,2	0,3	-	0,3	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	0,1	-	0,2	-	0,1	-
acetato de geranilo	1381	-	-	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	-	-	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,1	-	0,2	0,1
$\alpha$ -copaeno	1392	0,2	0,1	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
$\beta$ -cubebeno	1405	0,1	0,1	0,2	-	0,3	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -trans-bergamoteno	1441	-	0,2	-	-	-	0,1	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-	0,2	-	-	-
trans-cariofileno	1445	4,3	1,5	2,3	0,9	3,0	0,5	5,3	0,8	8,9	3,0	2,3	0,2	7,3	0,5	5,9	1,1	6,0	1,7
$\alpha$ -humuleno	1469	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1	-
allo-aromadendreno	1481	2,1	0,6	0,3	-	-	0,1	0,6	-	0,4	-	0,5	-	0,6	-	0,3	-	-	-
ar-curcumeno	1491	-	0,1	-	-	-	-	0,2	-	0,1	-	-	0,1	0,2	-	0,2	0,1	0,3	0,1
$\beta$ -himachaleno	1506	0,2	0,8	0,3	-	0,4	-	-	-	0,3	0,1	0,1	-	0,1	-	0,8	-	0,6	0,1
$\gamma$ -muuroleno	1508	0,1	0,5	0,1	-	0,3	0,2	0,3	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1
bicyclogermacreno	1514	0,2	0,2	0,3	-	0,3	-	-	-	-	0,1	0,3	-	-	-	0,3	-	-	-
cubebol	1534	1,5	1,8	1,4	0,4	1,5	0,7	1,3	-	0,5	-	0,2	-	-	-	0,4	-	0,3	0,2
$\delta$ -cadineno	1539	0,6	0,2	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,2	0,4	0,1	-	0,1	0,3	0,1	-	0,1
$\beta$ -bisaboleno	1555	-	-	2,2	0,1	2,7	0,1	0,6	-	1,4	0,1	0,3	0,2	-	-	0,6	0,1	0,2	-
espatulenol	1600	0,2	0,2	0,3	0,6	0,2	1,1	1,0	-	0,3	-	0,3	-	0,1	-	0,3	2,0	0,1	-
óxido de cariofileno	1605	0,5	0,8	0,8	1,5	0,9	2,5	2,8	1,4	2,3	4,8	0,6	0,6	2,5	0,9	1,4	0,1	1,7	1,3
viridiflorol	1609	0,3	0,1	3,9	-	5,4	0,1	3,1	0,1	2,2	0,3	0,2	-	0,1	-	0,1	0,3	-	0,1
trans-isolongifolanone	1640	0,5	0,4	0,1	0,1	0,1	0,2	0,9	0,3	-	0,6	0,6	0,1	-	0,1	0,5	0,2	0,1	0,2
$\beta$ -eudesmol	1663	-	0,1	-	-	0,2	-	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	-	-	-	0,1	-	0,1

COMPUESTOS	I.K	GENOTIPOS																	
		A2		B1		B2		B3		C2		C3		D1		D2		D3	
		III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V	III	V
$\alpha$ -eudesmol	1686	0,4	-	0,1	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1	0,2	-	0,2	0,1	0,2	0,1	-	0,2	0,1	0,1
<b>% Total identificado</b>		<b>84,0</b>	<b>83,6</b>	<b>96,0</b>	<b>94,5</b>	<b>95,5</b>	<b>93,3</b>	<b>79,4</b>	<b>96,1</b>	<b>85,0</b>	<b>93,0</b>	<b>87,8</b>	<b>97,8</b>	<b>95,4</b>	<b>97,3</b>	<b>92,5</b>	<b>94,6</b>	<b>95,2</b>	<b>97,4</b>
Monoterpenes hidrocarbonados		55,3	48,9	37,9	26,1	34,4	23,8	21,8	18,9	26,8	24,5	34,6	27,8	32,1	23,4	31,5	25,4	43,9	29,9
Monoterpenes oxigenados		17,8	29,1	45,9	64,6	45,8	63,7	40,8	74,3	41,3	59,2	46,8	68,5	52	72,2	49,8	64,8	41,8	63,4
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>73,1</b>	<b>78,0</b>	<b>83,8</b>	<b>90,7</b>	<b>80,2</b>	<b>87,5</b>	<b>62,6</b>	<b>93,2</b>	<b>68,1</b>	<b>83,7</b>	<b>81,4</b>	<b>96,3</b>	<b>84,1</b>	<b>95,6</b>	<b>81,3</b>	<b>90,2</b>	<b>85,7</b>	<b>93,3</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		9,2	4,2	7,3	2,1	8,4	2,9	9,3	0,9	11,9	3,5	4,5	0,6	8,5	0,6	9,2	3,5	7,6	2,3
Sesquiterpenos oxigenados		1,7	1,4	4,9	1,7	6,9	2,9	7,5	2	5	5,8	1,9	0,9	2,8	1,1	2	0,9	1,9	1,8
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>10,9</b>	<b>5,6</b>	<b>12,2</b>	<b>3,8</b>	<b>15,3</b>	<b>5,8</b>	<b>16,8</b>	<b>2,9</b>	<b>16,9</b>	<b>9,3</b>	<b>6,4</b>	<b>1,5</b>	<b>11,3</b>	<b>1,7</b>	<b>11,2</b>	<b>4,4</b>	<b>9,5</b>	<b>4,1</b>

## VII.1.3. Abonado nitrogenado

Tabla H.- Abonado nitrogenado. Composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* en la campaña 2010.

Compuesto	I.K.	DOSIS DE ABONADO NITROGENADO			
		Testigo	20 U.F/ha	45 U.F/ha	65 U.F/ha
tricicleno	922	0,1	0,2	0,1	0,1
$\alpha$ -tuyeno	925	0,3	0,6	0,3	0,4
$\alpha$ -pineno	932	8,6	12,5	8,1	10,7
canfeno	949	2,3	3,6	2,6	2,9
sabineno	972	1,5	1,7	1,3	1,0
$\beta$ -pineno	977	8,4	8,9	6,8	7,7
mirceno	988	5,3	3,5	5,6	4,6
$\alpha$ -terpineno	1024	0,8	2,4	0,8	0,9
limoneno	1029	4,4	2,4	3,9	4,5
1,8 cineol	1032	36,6	18,3	26,6	30,2
(Z)- $\beta$ -ocimeno	1046	0,1	0,2	0,1	0,1
$\gamma$ -terpineno	1058	1,6	5,1	2,4	2,2
cis-sabineno hidrato	1070	0,7	0,6	0,7	0,7
linalol	1100	0,7	0,8	0,4	0,3
alcanfor	1149	6,0	6,6	7,3	8,0
borneol	1174	1,7	3,5	1,5	2,0
terpinen-4-ol	1182	0,4	0,3	1,5	0,3
$\alpha$ -terpineol	1197	1,1	0,6	0,6	0,7
nerol	1249	0,2	-	-	-
geraniol	1251	0,2	-	0,4	0,2
acetato de bornilo	1285	0,3	0,4	0,5	0,2
acetato de terpinen-4-ol	1298	0,9	-	0,1	-
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1350	1,2	-	0,4	0,5
$\alpha$ -cubebeno	1355	0,1	0,2	0,1	0,1
trans-cariofileno	1428	3,6	3,4	5,5	5,0
aromadendreno	1462	2,3	1,6	3,3	2,3
valenceno	1498	1,0	0,1	0,6	0,2
espatulenol	1600	3,1	15,4	7,6	6,2
óxido de cariofileno	1610	-	0,1	0,1	-
viridiflorol	1614	0,5	0,8	0,8	0,3
<b>% Total identificado</b>		<b>94,1</b>	<b>94,0</b>	<b>91,2</b>	<b>92,5</b>
Monoterpenos hidrocarbonados		31,7	35,8	29,5	32,8
Monoterpenos oxigenados		51,8	36,6	42,6	45,5
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>83,5</b>	<b>72,4</b>	<b>72,1</b>	<b>78,3</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		6,9	5,1	9,4	7,5
Sesquiterpenos oxigenados		3,6	16,3	8,5	6,5
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>10,5</b>	<b>21,4</b>	<b>17,9</b>	<b>14,0</b>

Tabla I.- Abonado nitrogenado. Composición química de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* en la campaña 2011.

COMPUESTOS	I.K.	DOSIS DE ABONADO NITROGENADO			
		Testigo	20 U.F/ha	45 U.F/ha	65 U.F/ha
$\alpha$ -tuyeno	931	0,4	0,3	0,3	0,3
$\alpha$ -pineno	942	7,9	14,2	13,8	11,7
canfeno	961	2,3	2,4	1,8	2,1
octen-3-ol	978	0,1	0,1	0,2	0,1
sabineno	980	2,0	1,6	1,9	2,3
$\beta$ -pineno + mirceno	990	14,5	13,3	13,7	14,7
$\alpha$ -felandreno	1024	0,2	0,2	0,2	0,2
<i>p</i> -cimeno	1032	0,8	0,9	1,1	0,9
limoneno	1037	5,0	3,7	4,1	4,3
1,8-cineol	1044	35,3	25,4	35,4	33,9
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	1047	0,1	0,1	0,1	0,1
$\gamma$ -terpineno	1065	2,2	2,8	3,1	2,7
<i>cis</i> -sabineno hidrato	1078	0,8	0,7	0,8	0,8
$\alpha$ -terpinoleno	1093	0,2	0,2	0,2	0,2
linalol	1101	0,1	0,3	0,2	0,2
octen-1-ol-acetato	1110	0,3	0,1	0,1	0,1
$\alpha$ -tuyona	1117	0,1	0,1	0,1	0,1
alcanfor	1164	5,1	5,0	4,8	5,0
óxido de $\beta$ -pineno	1181	0,5	0,4	0,3	0,5
borneol	1187	1,7	2,4	1,6	1,7
terpinen-4-ol	1193	0,3	0,3	0,3	0,3
$\alpha$ -terpineol	1206	0,9	0,5	0,5	0,9
acetato de bornilo	1295	0,9	0,9	0,5	0,6
acetato de $\alpha$ -terpenilo	1352	0,9	-	0,6	0,8
<i>trans</i> -cariofileno	1441	3,8	4,5	3,6	3,7
<i>allo</i> -aromadendreno	1477	1,7	2,0	1,3	1,2
<i>ar</i> -curcumeno	1490	0,1	0,1	0,1	
$\beta$ -himachaleno	1501	0,1	0,1	0,2	0,1
$\gamma$ -muroleno	1514	0,1	0,1	0,1	
biciclogermacreno	1516	0,6	1,7	0,8	0,9
cubebol	1534	0,4	0,3	0,2	0,1
$\delta$ -cadineno	1538	0,1	0,1	0,1	0,1
espatulenol	1600	0,7	2,4	1,5	1,5
óxido de cariofileno	1609	1,3	2,4	1,7	1,9
viridiflorol	1621	4,2	5,8	1,7	4,1
$\beta$ -eudesmol	1681	0,2	0,3	0,1	0,1
<b>% Total identificado</b>		<b>95,9</b>	<b>95,4</b>	<b>96,8</b>	<b>97,8</b>
Monoterpenos hidrocarbonados		33,2	36,7	37,1	36,6
Monoterpenos oxigenados		59,4	39,2	48,6	47,9
<b>Monoterpenos totales</b>		<b>82,6</b>	<b>75,9</b>	<b>85,7</b>	<b>84,5</b>
Sesquiterpenos hidrocarbonados		6,9	8,9	6,4	6,1
Sesquiterpenos oxigenados		6,4	10,9	5,0	7,6
<b>Sesquiterpenos totales</b>		<b>13,3</b>	<b>19,8</b>	<b>11,4</b>	<b>13,7</b>

## ANEXO II

### VII.2. Análisis de suelos

En este Anexo se exponen los resultados de los análisis edafológicos de cada uno de los sustratos donde se han desarrollado las plantas de esta Tesis doctoral. Se trata de 6 análisis completos con determinaciones físicas y químicas de las principales características edáficas. Los análisis corresponden a la finca de aromáticas del C.I.A de Albaladejito (tabla J), al compost utilizado como sustrato para las macetas (tabla K), a la población A (tabla L), a la población B (tabla M), a la población C (tabla N) y a la población D (tabla Ñ).

Tabla J.- Determinación analítica de suelo de la finca de aromáticas del Centro de Investigación Agraria de Albaladejito (Cuenca).

<b>TEXTURA (U.S.D.A)</b> <b>Arena 60%</b> <b>Limo 22%</b> <b>Arcilla 18%</b> <b>Franco arenosa</b>								
DETERMINACIONES	Uds.	Valor	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Observaciones
pH	mmhos/cm	8,3	*****	*****	*****	**		Básico
CE		0,42						Ligeramente salino
Cloruros		30						Medio
Sulfatos	mg/yeso/100 g de suelo	11						
Materia orgánica total	%	1,45	*****	*****				Bajo
Nitrógeno total	%	0,08	*****	*****				Bajo
Relación C/N		11						Normal liberación de nitrógeno
Nitrógeno nítrico	ppm	6						
Fósforo asimilable	ppm	35	*****	*****	*****	*****	**	Muy alto
Carbonatos totales	%	21,3	*****	*****	*****	*****		Alto
Caliza activa	%	5,2						Bajo
Potasio asimilable	meq/100g	1,17	*****	*****	*****	*****	**	Muy alto
Sodio asimilable	meq/100g	0,68	*****	*****				Bajo
Calcio asimilable	meq/100g	22,97	*****	*****	*****	*****	**	Muy alto
Magnesio asimilable	meq/100g	1,13	*****	*****				Bajo
Relación K/Mg		1,04						Posible carencias de magnesio
Relación Ca/Mag		20						Posible carencias de magnesio
Capacidad intercambio catiónico	meq/100g	14						Medio
Hierro asimilable	ppm	1,79						Bajo
Zinc asimilable	ppm	0,14						Bajo
Cobre asimilable	ppm	0,39						Medio
Manganeso asimilable	ppm	1,78						Medio
Boro asimilable	ppm	2						Medio



Tabla K.- Determinación analítica del suelo (compost) en los ensayos con cámaras de cultivo.

<b>TEXTURA (U.S.D.A)</b> <b>Arena 63%</b> <b>Limo 23%</b> <b>Arcilla 11%</b> <b>Franco arenosa</b>								
DETERMINACIONES	Uds.	Valor	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Observaciones
pH	mmhos/cm	7,4	*****	*****	*****			Neutro
CE		8,89						Muy salino
Cloruros		132						Alto
Sulfatos	mg/yeso/100 g de suelo	591						
Materia orgánica total	%	22,71	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Nitrógeno total	%	1,01	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Relación C/N		13						Escasa liberación de nitrógeno
Nitrógeno nítrico	ppm	334						
Fosforo asimilable	ppm	548	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Carbonatos totales	%	20,0	*****	*****	*****			Medio
Caliza activa	%	5,2						Bajo
Potasio asimilable	meq/100g	8,94	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Sodio asimilable	meq/100g	3,73	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Calcio asimilable	meq/100g	28,36	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Magnesio asimilable	meq/100g	5,93	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Relación K/Mg		1,51						Posible carencias de magnesio
Relación Ca/Mg		5						Adecuada
Capacidad intercambio catiónico	meq/100g	33						Muy elevada
Hierro asimilable	ppm	19						Alto
Zinc amililable	ppm	11						Alto
Cobre asimilable	ppm	10						Alto
Manganseo asimilable	ppm	29						Alto
Boro asimilable	ppm	24						Alto

Tabla L.- Determinacion analítica del suelo de la población A (Torralba).

<b>TEXTURA (U.S.D.A)</b> <b>Arena 60%</b> <b>Limo 24%</b> <b>Arcilla 16%</b> <b>Franco arenosa</b>								
DETERMINACIONES	Uds.	Valor	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Observaciones
pH	mmhos/cm	8,4	*****	*****	*****	*****		Básico
CE		0,39						Ligeramente salino
Cloruros		36						Medio
Sulfatos	mg/yeso/100 g de suelo	17						
Materia orgánica total	%	1,73	*****	*****				Bajo
Nitrógeno total	%	0,08	*****	*****				Bajo
Relación C/N		12						Normal liberación de nitrógeno
Nitrógeno nítrico	ppm	4						
Fosforo asimilable	ppm	8	*****	*****				Bajo
Carbonatos totales	%	29,0	*****	*****	*****	*****		Alto
Caliza activa	%	5,1						Bajo
Potasio asimilable	meq/100g	0,47	*****	*****	*****			Medio
Sodio asimilable	meq/100g	0,57	*****	*****				Bajo
Calcio asimilable	meq/100g	22,27	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Magnesio asimilable	meq/100g	0,83	*****	*****				Bajo
Relación K/Mg		0,57						Posibles carencias de magnesio
Relación Ca/Mag		27						Posibles carencias de magnesio
Capacidad intercambio catiónico	meq/100g	10						Medio
Hierro asimilable	ppm	1,96						Bajo
Zinc asimilable	ppm	0,04						Bajo
Cobre asimilable	ppm	0,46						Medio
Manganeso asimilable	ppm	3,57						Medio
Boro asimilable	ppm	1,59						Medio

Tabla M.- Determinacion analítica del suelo de la población B (Campillo-Paravientos).

<b>TEXTURA (U.S.D.A)</b> <b>Arena 55%</b> <b>Limo 22%</b> <b>Arcilla 23%</b> <b>Franco arenosa</b>								
DETERMINACIONES	Uds.	Valor	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Observaciones
pH	mmhos/cm	8,3	*****	*****	*****	*****		Básico
CE		0,41						Ligeramente salino
Cloruros		33						Medio
Sulfatos	mg/yeso/100 g de suelo	6						
Materia orgánica total	%	4,43	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Nitrógeno total	%	0,18	*****	*****	*****			Medio
Relación C/N		14						Escasa liberación de nitrógeno
Nitrógeno nítrico	ppm	5						
Fósforo asimilable	ppm	7	*****	*****				Bajo
Carbonatos totales	%	25,1	*****	*****	*****	*****		Alto
Caliza activa	%	2,6						Bajo
Potasio asimilable	meq/100g	0,73	*****	*****	*****	*****		Alto
Sodio asimilable	meq/100g	0,76	*****	*****				Bajo
Calcio asimilable	meq/100g	25,18	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Magnesio asimilable	meq/100g	2,15	*****	*****	*****			Medio
Relación K/Mg		0,34						Adecuada
Relación Ca/Mag		12						Posibles carencias de magnesio
Capacidad intercambio catiónico	meq/100g	4						Muy débil
Hierro asimilable	ppm	6,77						Alto
Zinc amililable	ppm	0,19						Bajo
Cobre asimilable	ppm	0,79						Medio
Manganseo asimilable	ppm	10,19						Alto
Boro asimilable	ppm	1,59						Medio

Tabla N.- Determinacion analítica del suelo de la población C (Huélamo).

<b>TEXTURA (U.S.D.A)</b> <b>Arena 70%</b> <b>Limo 25%</b> <b>Arcilla 5%</b> <b>Franco arenosa</b>								
DETERMINACIONES	Uds.	Valor	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Observaciones
pH	mmhos/cm	9,1	*****	*****	*****	*****	*****	Muy básico
CE		0,37						Ligeramente salino
Cloruros		35						Medio
Sulfatos	mg/yeso/100 g de suelo	15						
Materia orgánica total	%	0,41	*****					Muy bajo
Nitrógeno total	%	0,02	*****					Muy bajo
Relación C/N		10						Normal liberación de nitrógeno
Nitrógeno nítrico	ppm	0,26						
Fósforo asimilable	ppm	6	*****					Muy bajo
Carbonatos totales	%	29,8	*****	*****	*****	*****		Alto
Caliza activa	%	3,3						Bajo
Potasio asimilable	meq/100g	0,08	*****					Muy bajo
Sodio asimilable	meq/100g	0,59	*****	*****				Bajo
Calcio asimilable	meq/100g	16,62	*****	*****	*****	*****	*****	Muy alto
Magnesio asimilable	meq/100g	1,37	*****	*****				Bajo
Relación K/Mg		0,06						Posibles carencias de potasio
Relación Ca/Mag		12						Posibles carencias de magnesio
Capacidad intercambio catiónico	meq/100g	4						Muy débil
Hierro asimilable	ppm	2,84						Medio
Zinc asimilable	ppm	0,05						Bajo
Cobre asimilable	ppm	0,18						Medio
Manganeso asimilable	ppm	0,25						Bajo
Boro asimilable	ppm	0						Bajo

Tabla Ñ.- Determinacion analítica del suelo de la población D (Huerta del Marquesado).

<b>TEXTURA (U.S.D.A)</b> <b>Arena 66%</b> <b>Limo 19%</b> <b>Arcilla 15%</b> <b>Franco arenosa</b>								
DETERMINACIONES	Uds.	Valor	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	Observaciones
pH	mmhos/cm	8,3	*****	*****	*****	*****		Básico
CE		0,31						No salino
Cloruros		45						Medio
Sulfatos	mg/yeso/100 g de suelo	18						
Materia orgánica total	%	3,35	*****	*****	*****	*****		Alto
Nitrógeno total	%	0,13	*****	*****	*****			Medio
Relación C/N		15						Escasa liberación de nitrógeno
Nitrógeno nítrico	ppm	4						
Fósforo asimilable	ppm	7	*****	*****				Bajo
Carbonatos totales	%	4,7	*****					Muy bajo
Caliza activa	%	3,1						Bajo
Potasio asimilable	meq/100g	0,39	*****	*****				Bajo
Sodio asimilable	meq/100g	0,59	*****	*****				Bajo
Calcio asimilable	meq/100g	12,76	*****	*****	*****	*****	***	Muy alto
Magnesio asimilable	meq/100g	2,52	*****	*****	*****	*****		Alto
Relación K/Mg		0,15						Adecuada
Relación Ca/Mg		5						Adecuada
Capacidad intercambio catiónico	meq/100g	11						Medio
Hierro asimilable	ppm	8,21						Alto
Zinc asimilable	ppm	0,15						Bajo
Cobre asimilable	ppm	0,72						Medio
Manganeso asimilable	ppm	5,1						Alto
Boro asimilable	ppm	1,6						Medio

## VII.3. Datos meteorológicos. Diagramas ombroclimáticos

MES	2008					2009				
	Temperatura (°C)			Lluvia (mm)	Viento (km/h)	Temperatura (°C)			Lluvia (mm)	Viento (km/h)
	Max	Min	Med	Total	Med	Max	Min	Med	Total	Med
ENERO	18,8	-6,4	4,3	23,4	2,3	14,3	-10,3	2,2	58,6	2,8
FEBRERO	17,6	-7,6	5,4	26,8	3,7	19,6	-6,4	3,7	42,2	3,4
MARZO	21,8	-4,1	6,9	15,6	6,0	22,9	-3,2	7,8	53,4	3,4
ABRIL	25,8	-2,2	10,3	105,2	4,3	24,3	-2,3	8,5	44,4	4,0
MAYO	27,1	-0,9	12,5	102,4	2,9	30,7	0,5	15,9	8,4	3,1
JUNIO	33,7	5,4	17,7	47,8	3,0	35,9	6,8	24,7	1,0	2,3
JULIO	35,7	7,4	21,3	1,6	2,8	37,2	7,7	27,6	0,2	2,8
AGOSTO	36,5	4,9	22,2	8,0	3,2	35,6	9,9	27,4	0,0	2,2
SEPTIEMBRE	28,7	3,4	16,5	33,8	3,1	31,3	4,1	17,2	53,8	2,1
OCTUBRE	23,7	-2,9	11,5	88,2	2,9	27,3	-3,2	13,0	37,8	1,5
NOVIEMBRE	16,7	-8,4	4,3	32,2	3,6	20,9	-4,7	7,3	10,1	0,5
DICIEMBRE	12,1	-8,1	2,7	35,5	4,1	17,5	-12,6	3,8	172,2	0,8

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN AGRARIA DE ALBALADEJITO, CUENCA

MES	2010					2011				
	Temperatura (°C)			Lluvia (mm)	Viento (km/h)	Temperatura (°C)			Lluvia (mm)	Viento (km/h)
	Max	Min	Med	Total	Med	Max	Min	Med	Total	Med
ENERO	11,7	-11,5	2,8	71,6	0,6	16,9	-12,3	3,3	30,6	0,4
FEBRERO	17,6	-8,2	3,8	88,4	1,0	20,0	-6,2	4,8	44,0	0,7
MARZO	19,4	-6,7	5,9	39,0	0,9	22,6	-3,3	7,1	15,2	1,2
ABRIL	26,9	-2,8	10,6	97,0	0,6	28,8	0,9	12,8	74,0	0,7
MAYO	28,7	-0,7	12,6	78,6	0,8	30,7	4,2	15,2	85,2	0,4
JUNIO	31,3	3,2	17,8	63,8	0,5	34,9	6,3	19,7	18,6	0,4
JULIO	35,5	10,4	23,7	1,2	0,5	33,8	8,0	26,0	0,0	0,4
AGOSTO	36,3	9,6	21,4	12,8	0,4	36,7	6,4	26,8	0,4	0,5
SEPTIEMBRE	31,7	0,2	16,5	36,4	0,4	33,5	4,2	22,2	0,0	0,4
OCTUBRE	25,6	-3,2	10,4	40,2	0,5	29,7	0,1	12,5	30,6	0,4
NOVIEMBRE	22,2	-6,6	4,9	49,8	0,4	19,2	-2,8	8,3	61,0	0,7
DICIEMBRE	16,6	-10,2	3,2	38,5	0,5	17,7	-4,0	4,4	10,3	0,2

Diagrama ombrotérmico año 2008

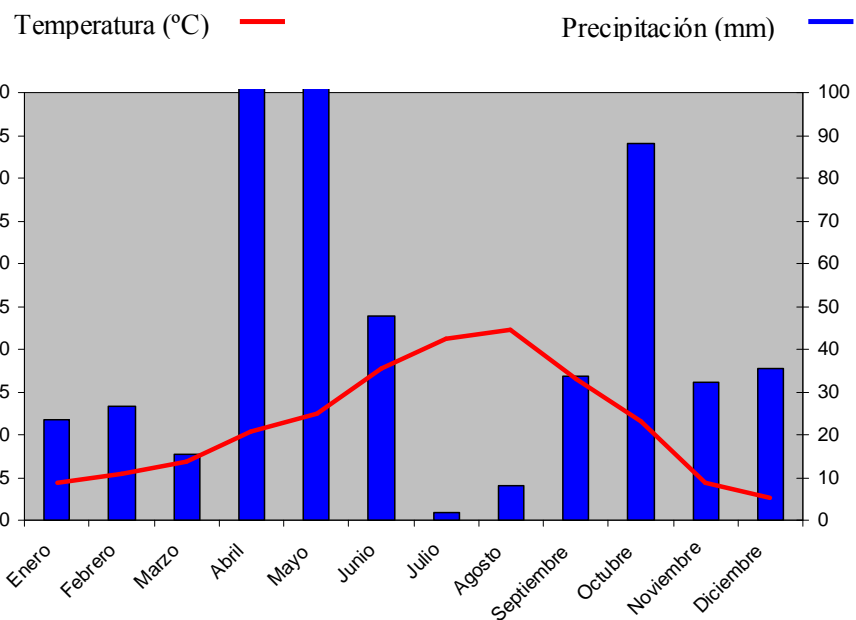


Diagrama ombrotérmico año 2009

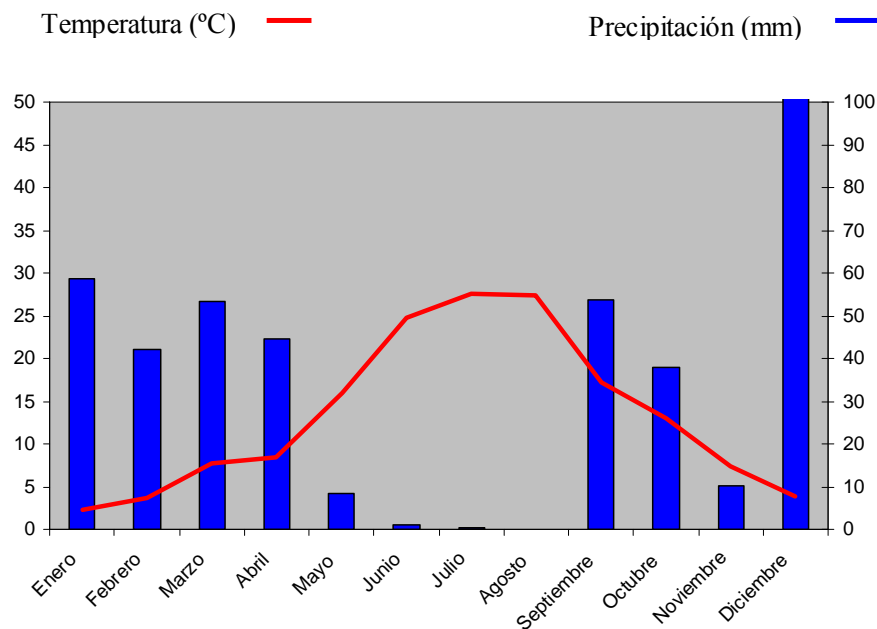


Diagrama ombrotérmico año 2010

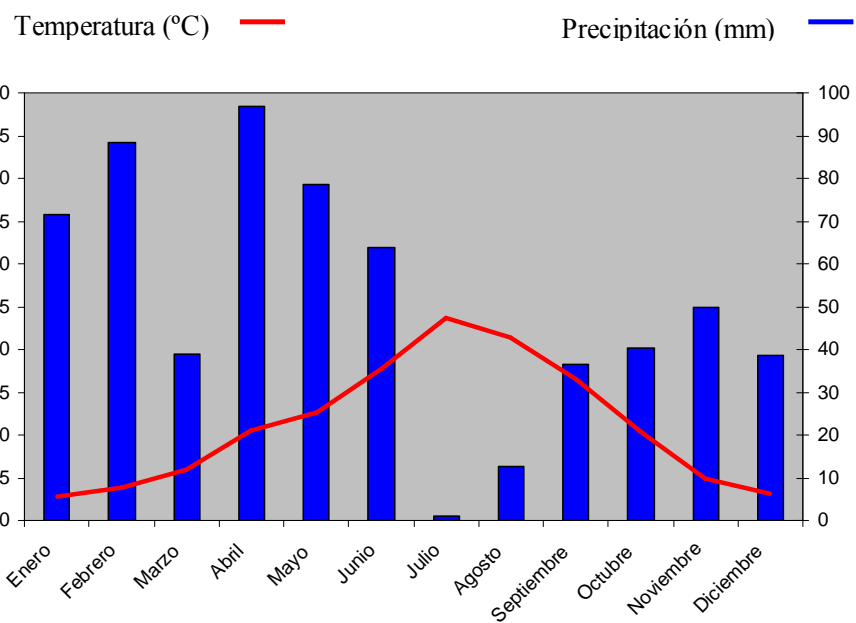
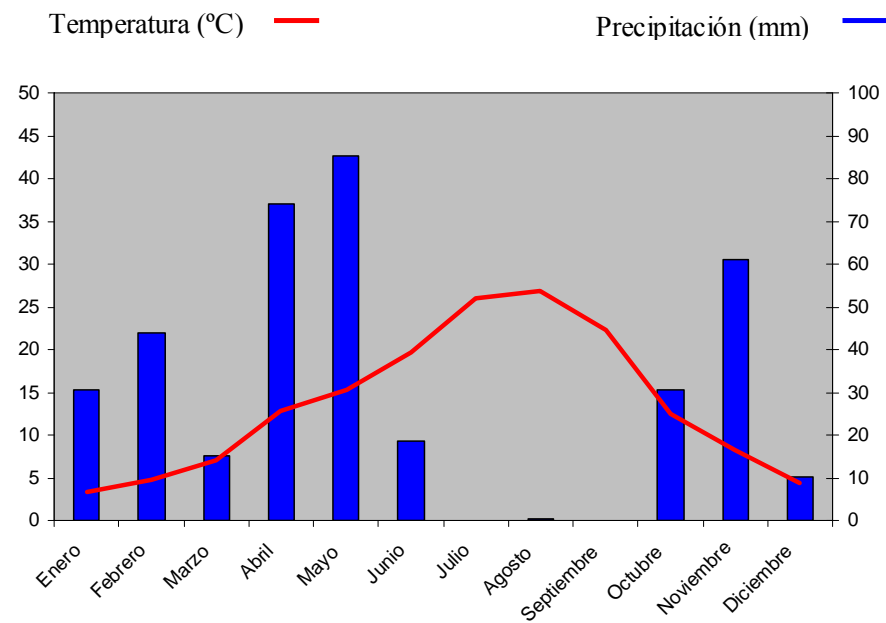


Diagrama ombrotérmico año 2011



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadeh, B., Farahani, H.A., Valadabadi, S.A. & Darvishi, H.H. **2009**. Nitrogen fertilizer influence on quantity and quality values of balm (*Melissa officinalis* L.). **Journal of Agricultural Extension and Rural Development**, 1, 31-33.
- Adams, R.P., Gonzalez Elizondo, M.S., Gonzalez Elizondo, M. & Slinkman, E. **2006**. DNA fingerprint and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico. **Biochemical Systematics and Ecology**, 34, 205-211.
- Adams, R.P. **2001**. Identification of essential oil components by gas chromatography-mass spectrometry. **Allured Publications**. U.S.A.
- Adams, R.P. **2007**. Identification of essential oil components by gas chromatography-mass spectrometry. **Allured Publications**. U.S.A.
- Agostini, G., Agostini, F., Atti-Serafini, L. & Echeverrigaray, S. **2006**. Essential oil variability within and among populations of *Cunila incisa* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, 34, 802-808.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. & Cabras, P. **2006**. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. spp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 4364-4370.
- Arabaci, O. & Bayram, E. **2004**. The effect of nitrogen fertilization and different plant densities on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (Basil). **Journal of Agronomy**, 3, 255-262.
- Arimura, G., Matsui, K. & Takabayashi, J. **2009**. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant and Cell Physiology**, 50, 911-923.
- Argyropoulus, E., Eleftherohorinos, G.I. & Vokou, D. **2008**. *In vitro* evaluation of essential oils from Mediterranean aromatic plants of the Lamiaceae for weed control in tomato and cotton crops. **Allelopathy Journal**, 22, 69-78.
- Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaeili, M. A., Sonboli, A., Ansari, N. & Khodagholi, F. **2010**. *In vitro* antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: A comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 1341-1349.



## BIBLIOGRAFÍA

- Auria, F.D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L. & Mazzanti, G. **2005**. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. **Medical Mycology**, 43, 391-396.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. **1993**. Fisiología y Bioquímica Vegetal. **McGraw-Hill-Interamericana**. Madrid.
- Azizi, A., Yan, F. & Honermeier. **2009**. Herbage yield, Essentials oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. **Industrial Crops and Products**, 29, 554-561.
- Azirak S, Karaman S. **2008**. Allelopathic effect of some essential oils and components on germinación of weed species. **Acta Agriculturae Scandinavica B-S-P**, 58, 88-92.
- Badawy, M.E.I., El-Arami, S.A.A. & Abdelgaleil, S.A.M. **2010**. Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, 52, 261-274.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Avebeck, D. & Idaomar, M. **2008**. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 446-475.
- Bandoni, A., Retta, D., Di Leo Lira, P. & Baren, C.M. **2009**. ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 8, 318-322.
- Baranauskiene, R., Venskutonis, R., Viskelis, P. & Dambrauskiene, E. **2003**. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 7751-7758.
- Baricevic, D. & Bartol, T. **2000**. In: Sage, The genus Salvia. Kintzios, S.E. **Harwood Academic Publisher**. Amsterdam.
- Barra, A. **2009**. Factors affecting chemicals variability of essentials oils: a review of recent developments. **Natural Products Communications**, 4, 1147-1154.
- Barreyro, R., Ringuet, J. & Agrícola, S. **2005**. Nitrogen fertilization and yield in oregan (*Origanum x applii*). **Ciencia e Investigación Agraria**, 32, 34-38.
- Barry, E.F. & Grob, R.L. **2007**. Columns for gas chromatography: performance and selection. **John Wiley & Sons**. New Jersey.
- Baser, K.H.C. **1995**. Analysis and quality assessment of essential oils. In: K.T. De Silva. A Manual on the Essential Oil Industry. **United Nations Industrial Development Organization**. Vienna.

- Batish, D.R., Singh, H. P. Kohli, R. K. & Kaur, R. **2008**. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, 256, 2166–2174.
- Baum, S. F., Karanastasis, L. & Rost, T. L. **1998**. Morphogenetic effect of the herbicide Cinch on *Arabidopsis thaliana* root development. **Journal of Plant Growth Regulation**, 17, 107-114.
- Benno, F., Zimmermann, Stephan G. Walch, Laura Ngaba Tinzoh. Wolf Stühlinger, Dirk W. Lachenmeier. **2011**. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea) **Journal of Chromatography B**, 879, 2459-2464.
- Bergougnot, V., Caissard, J.C., Jullien, F., Magnard, J.L., Scalliet, G., Cock, J.M., Hugueney, P. & Baudino, S. **2007**. Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds, **Planta**, 226, 853-866.
- Bernays, E.A. & Chapman. **1994**. Host-plant selection by phytophagous insects. **Chapman & Hall**, New York.
- Bienes, R., Jiménez-Ballesta, R., Ruíz-Colmenero, M., Arévalo, D., Álvarez, A. & Marqués, M.J. **2010**. Incidencia del cultivo de plantas aromáticas y medicinales sobre la erosión de suelos agrícolas. **Spanish Journal of Rural Development**, 1, 19-28.
- Boszorményi, A., Héthelyi, E., Farkas, A., Horváth, G., Papp, N., Lemberkovic, E. & Szoke, E. **2009**. Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 4663-4667.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E. **2001**. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, 161, 839-851.
- Bouvier, F., Backhaus, R.A. & Camara, A. **1998**. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, 273, 30651–30659.
- Boyle, T.H., Craker, L.E. & Simon, J.E. **1991**. Growing medium and fertilization regime influence growth and essential oil content of rosemary. **Hortscience**, 26, 33-34.
- Bozin, B., Dukic, N.M., Samojlik, I. & Jovin, E. **2007**. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 7879-7885.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S.III. & Klein, D.R. **1983**. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**, 40, 357-368.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burillo, J. **2003**. Investigación y experimentación de plantas aromáticas y medicinales en Aragón. **Departamento de Agricultura. Gobierno de Aragón**. Zaragoza.
- Burt, S. **2004**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, 223-253.
- Cañigüeral, S., Vila, R., Vicario, G., Tomas, X. & Adzet, T. **2003**. Chemometrics and essential oil analysis: chemical polymorphism in two *Thymus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, 22, 307-315.
- Casermeiro, M.A., Molinab, J.A., de la Cruz Caravaca, M.T., Hernando Costa, J., Hernando Massanet, M.I. & Moreno, P.S. **2003**. Influence of scrubs on runoff and sediment loss in soils of Mediterranean climate. **Catena**, 57, 91-107.
- Cavaleiro, C., Rezzi, S., Salgueiro, L., Bighelli, A., Casanova, J. & Proença da Cunha, A. **2001**. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Portugal. **Biochemical Systematics and Ecology**, 29, 1175-1183.
- CBI. **2009**. Natural Ingredients for Cosmetics: The EU Market for Essential Oils for Cosmetics. <http://www.cbi.eu>
- Chappell, J., **2008**. Production platforms for the molecular pharming of alkaloid diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105, 7897-7898.
- Chatzopoulou, P.S., Koutsos, T.V., Katsiotis, S.T. **2006**. Study of nitrogen fertilization rate on fennel cultivars for essential oil yield and composition. **Journal of Vegetable Science**, 12, 85-93.
- Chen, M.S. **2008**. Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science**, 15, 101-114.
- Chericoni, S., Flamini, G., Campeol, E., Cioni, P.L. & Morelli, I. **2004**. GC-MS análisis of the essential oil from the aerial partes of *Artemisia verlotiorum*: Variability during the year. **Biochemical Systematics and Ecology**, 32, 423-429.
- Clark, R.J. & Menary, R.C. **1980**. Environmental effects on peppermint (*M. piperita* L) Effect of day length, photon flux density, night and day temperature on yield and composition of peppermint oil. **Australian Journal of Plant Physiology**, 7, 685-692.
- Clevenger, J. F. **1928**. Apparatus for the determination of volatile oil. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, 17, 345-349.

- Codd, L.E.W. **1985**. Lamiaceae. In: Flora of Southern Africa 28,4. **Botanical Research Institute**, Pretoria.
- COMTRADE, **2010**. International Merchandise Trade Statistics (IMTS). <http://comtrade.un.org>
- Coronel, A., Cerda-García-Rojas, C.M., Joseph-Nathan, P. & Catalán, C.A.N. **2006**. Chemical composition, seasonal variation and new sesquiterpene alcohol from the essential oil of *Lippia integrifolia*. **Flavour and Fragrance Journal**. 21, 839-847.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou E. & Harvala, C. **2003**. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. **Phytotherapy Research**, 17, 194-195.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12, 564-582.
- CPPARM, **2010**. Comité des plantes à parfum aromatiques et médicinales. <http://www.cpparm.org>
- Crespo, M.E., Jiménez, J., Navarro, M.C. & Zarzuelo, A. **1986**. The essential oils of *Salvia lavandulifolia* ssp. *oxyodon*. A study of its vegetative cycle. **Planta Medica**, 52, 367- 369.
- Croteau, R., Gurbewitz, S., Johnson, M.A. & Fisk, H.J. **1987**. Biochemistry of oleoresinosis: monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole pine saplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. **Plant Physiology**, 85, 1123-1128.
- Curado, M.A., Oliveira, C.B.A., Jesús, J.G., Santos, S.C., Seraphin, J.C. & Ferri, P.H. **2006**. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, 67, 2363-2369.
- Curtin, J.S. & Mullen, G.J. **2007**. Physical properties of some intensively cultivated soils of Ireland amended with spent mushroom compost. **Land Degradation & Development**, 18, 355–368.
- Dabrio, M.V. **1973**. Cromatografía de gases II. **Alhambra**, S.A. Madrid.
- D'Antuono, L.F., Galletti, G.C. & Bocchini, P. **2000**. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). **Annals of Botany**, 86, 471-478.
- Das, S. & Rosazza, J.P.N. **2006**. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. **Journal of Natural Products**, 69, 499–508.

- Da-Silva, F., Santos, R.H.S., Diniz, E.R., Barbosa, L.C.A., Casali, V.X.D. & De-Lima, R.R. **2003**. Content and composition of basil essential oil at two different hours in the day and two seasons. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6, 33-38.
- De Feo, V., Bruno, M., Tahiri, B., Napolitano, F., Senatore, F. **2003**. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Thymus spinulosus* Tem (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 3849-3851.
- De la Fuente, E.B., Gil, A., Lenardis, A.E., López, M., Suárez, S.A., Ghersa, C.M. & Grass M.Y. **2003**. Response of winter crops differing in grain yield and essential oil production to some agronomic practices and environmental gradient in the Rolling Pampa, Argentina. **Agricultures Ecosystems & Environment**, 99, 159-169.
- De Vicenci, M., Silano, M., De Vicenci, A., Maialetti, F. & Schazzocchio, B. **2002**. Constituents of aromatic plants: Eucalyptol. **Fitoterapia**, 73, 269-275.
- Dordas, C. & Sioulas, C. **2008**. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. **Industrial Crops and Products**, 27, 75-85.
- Drazic, S. & Brkic, D. **2001**. Variability of chemical properties of sage (*Salvia officinalis* L.) **Rostlinna Vyroba**, 47, 225-227.
- Duriyaprapan, S., Britten, B.E. & Basford, K.E. **1986**. The effect of temperature on growth, oil yield and oil quality of Japanese mint. **Annals of Botany**, 58, 729-736.
- Dudareva, N. Pichersky, E. & Gershenzon, J. **2004**. Biochemistry of Plant Volatiles. **Plant Physiology**, 135, 1893-1902.
- Dudareva, N., & Pichersky, E. **2008**. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, 19, 181-189.
- Echeverrigaray, G., Agostini, G., Tai-Serfeni, L., Paroul, N., Pauletti, G.F. & Atti dos Santos, A.C. **2001**. Correlation between the chemicals and genetic relationships among commercial thyme cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 4220-4223.
- Echeverrigaray, S., Fracar, F., Santos, A.C.A., Paroul, N., Wasum, R. & Serafini, L.A. **2003**. Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. **Biochemical Systematics and Ecology**, 31, 467-475.
- Economakis, C., Demetzos, C., Anastassaki, T., Papazoglou, V., Gazouli, M., Loukis, A., Thanos, C. & Harvala, C. **1999**. Volatile constituents of bracts and leaves of wild and cultivated *Origanum dictamnus*. **Planta Medica**, 65, 189-191.

- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnorn, S., Gürel, A., Aktas, L. & Gesheva. **2008**. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. **General and Applied Plant Physiology**, 34, 67-78.
- Ehsanipour, A., Razmjoo, J. & Zeinali, H. **2012**. Effect of nitrogen rates on yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions. **Industrial Crops and Products**, 35, 121-125.
- Exarchou, V.; Nenadis, N.; Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. & Boskou, D. **2002**. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 5294-5299.
- Fatima, S.F., Farooqi, A.H.A., Srikant, S. **2000**. Effect of drought stress and plant density on growth and essential oil metabolism in citronella java (*Cymbopogon winterianus*). **Journal of Aromatic and Medicinal Plants**, 22, 563-567.
- FAOSTAT. **2010**. The Agricultural trade domain. <http://faostat.fao.org>
- Farmacopea Europea. **2007**. 6ª Edición. **Dirección Europea de la Calidad de los Medicamentos y la Atención Sanitaria**. Estrasburgo.
- Figueiredo, A.C., J.G. Barroso, L.G. Pedro, and J.J.C. Scheffer, **1997**. Physiological aspects of Essentials production. In: Essential Oils: Basic and Applied Research. Franz, C., Mathe, A. & Buchbauer, G. **Carol Stream: Allured Publishing**.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G, Pedro, L.G. & Scheffer, J.J.C. **2008**. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, 23, 213-226.
- Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, L. B., Khan, S. I., Kobaisy, M., Skaltsounis, L. & Duke, S.O. **2007**. Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from Greek island of Crete. **Journal of Natural Medicines**, 61, 38-45.
- Fonseca, J. M., Rushing, J. W., Rajapakse, N. C., Thomas, R. L. & Riley, M. B. **2006**. Potential implications of medicinal plant production in controlled environments: the case of feverfew (*Tanacetum parthenium*). **HortScience**, 41, 531-535.
- Fowles, I.A. **1995**. Gas Chromatography. Second Edition. **John Wiley & Sons**. U.K.
- Franz, Ch., Hardh, K., Haelvae, S., Mueller, E., Pelzmann, H. & Ceylan, A. **1986**. Influence of ecological factors on yield and essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) **Acta Horticulturae**, 188, 157-162.

- Franz, C. **1993**. Domestication of wild growing medicinal plants. **Plant Research and Development**, 37, 101-111.
- Franz, C. **2000**. Biodiversity and random sampling in essential oil plants. **Lecture 31<sup>st</sup> ISEO**, Hamburg
- Franz, C. & Novak J. **2010**. In: Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. Baser, K.H.C & Buchbauer, G. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Gershenzon, J. & Dudareva, N. **2007**. Functional of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, 3, 408-414.
- Giannouli, A. & Kintzios, S. **2000**. In: The sage. The genus salvia. Kintzios, S. **Harwood Academic Publisher**, Amsterdam, pp, 69-81.
- Gião, M.S., Gomes, S., Madureira, A. R., Faria, A., Pestana, P., Conceição C., Pintado, M., Azevedo I. & Malcata, F. X. **2012**. Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**, 31, 761-767.
- Gil, A., Van Baren, C.M., Di Leo Lira, P.M., Bandoni, A. **2007**. Identification of genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 8864-8669.
- Gnani, G., Berteau, C.M. & Maffei, M. **2009**. PCR, sequencing and PCR-RFLP of the 5S-Rna-NTS region as a tool for the DNA fingerprinting of medicinal and aromatic plants. **Flavour and Fragrance Journal**, 25, 132-137.
- Gnani, G., Berteau, C.M., Ussai, M. & Maffei, M. **2010**. Comparative characterization of *Santolina insularis* chemotypes by essential oil composition, 5S-rRNA-NTS sequencing and EcoRV RFLP. **Phytochemistry**, 71, 930-936.
- González-Coloma, A., Guadano, A., Tonn C.E. & Sosa, M.A. **2005**. Antifeedant/insecticidal terpenes from *Asteraceae* and *Labiatae* species native to Argentinean semi-arid lands . **Zeitschrift fur Naturforschung**, 60, 855-861.
- Goodger, J.Q.D. & Woodrow, I.E. **2009**. The influence of ontogeny on essential oil traits when micropropagating *Eucalytus polybractera*. **Forest Ecology and Management**, 258, 650-656.
- Gora, J., Lis, A., Kula, J., Staniszewska, M. & Woloszyn, A. **2002**. Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. **Flavour and Fragrance Journal**, 17, 445-451.

- Gottlieb, O.R. **1982**. Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, An Essay into a Novel Botanical Discipline. **Springer-Verlag**, Heidelberg.
- Grau, A.F., Guardiola, J., Boatella, J., Barroeta, A. & Codony, R. **2000**. Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 1144-1159.
- Gruenwald, J. **2008**. The global Herbs and Botanical market. Neutraceuticals worlds. <http://www.neutraceuticalsworld.com>
- Guenther, A., Zimmerman, P. & Wildermuth, M. **1994**. Natural volatile organic compound emission rate estimates for U.S. woodland landscape. **Atmospheric Environment**, 28, 1197-1210.
- Guillén, M.D. & Ibargoitia, M.L. **1995**. Wild growing Spanish sage as a reaw material in the food industry. Study by gas chromatography/mass spectrometry of its essential oil and extracts in several organic solvents. **Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel**, 17, 129-134.
- Guillén, M.D., Cabo, N. & Burillo, J. **1996**. Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 70, 359-363.
- Guillén, M.D. & Manzanos, M.J. **1999**. Extractable componentes of the aerial parts of *Salvia lavandulifolia* and composition of the liquid smoke flavoring obtained from them. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 3016-3027.
- Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F. & Legendre, L. **2010**. Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. **Physiologia Plantarum**, 138, 150-163.
- Hadacek, F. **2002**. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 21, 273-322.
- Hamilton, J.G., Zangerl, R., Delucia, E.H. & Berenbaum, M.R., **2001**. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. **Ecology Letters**. 4, 86-95.
- Hassiotis, C.N. & Dina, E.I. **2011**. The effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) on development of two mycorrhizal fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 65, 628-634.
- Hay, R.K.M. **1993**. Physiology. In: Volatile Oil Crop: Their Biology, Biochemistry and Production. Hay, R.K.M. & Waterman, P. **Longman**. U.K.



- He, P.Q., Tian, L., Chen, K.S., Hao, L.H. & Li, G.Y. **2006**. Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. And its resistance to *Botrytis cinerea* Pers. by burdock oligosaccharide. **Journal of Integrative Plant Biology**, 48, 550-557.
- Heil, M., **2008**. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, 178, 41-61.
- Herms, D.A. & Mattson, W.J. **1992**. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**, 67, 283-335.
- Herraiz-Peñalver, Usano-Aleman, J., Cuadrado, J., Jordán, M.J., Lax, V., Sotomayor, J.A. & Palá-Paúl, J. **2010**. Essential oil composition of wild populations of *Salvia lavandulifolia* Vahl. from Castilla-La Mancha (Spain). **Biochemical Systematics and Ecology**, 38, 1224-1230.
- Herrmann, A. **2010**. The Chemistry and Biology of Volatiles. **John Wiley & Sons**. Genève.
- Holzinger, R., Sandoval-Soto, L., Rottenberger, S., Crutzen, P.J., Kesselmeier, J. **2000**. Emissions of volatile organic compounds from *Quercus ilex* L. measured by Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry under different environmental conditions. **Journal of Geophysical Research-Atmospheres**, 105, 20573-20579.
- Hornok, L. **1986**. Effect of environmental factor son the production of some essential oil plants. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Essential Oils, **Fragrances and Flavors**. Washington, D.C, U.S.A. 16-20 november.
- Hornok, L. **1988**. In: Flovors and Fragrances: A World Perspective, Lawrence, B.M., Mookherjee, B.D. & Willis, B.J. **Elsevier**: Amsterdam.
- Horwarth, A.B., Grayer, R.J., Keith-Lucas, D.M. & Simmonds, M.S.J. **2008**. Chemical characterisation of wild populations of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, 36, 117-133.
- Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., Ben Brahim, N. & Sebei, H. **2010**. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for genotypic influence. **Food Chemistry**, 123, 1098-1104.
- Houerou, H.N. **2000**. Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semiarid zones of west Asia and North Africa. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, 14, 101-135.

- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A.M. & Cavrini, V. **2002**. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variation during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 29, 691-700.
- Hummelbrunner, L.A. & Isman, M.B. **2001**. Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 715-720.
- Hussain, I.A., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, R. **2008**. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, 108, 986-995.
- Isman, M.B., Miresmailli, S. & Machial, C. **2011**. Commercial opportunities for pesticide based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochemistry Reviews**, 10, 197-204.
- Izco, J. **2004**. Botánica. 2ª Edición. **McGraw-Hill. Interamericana**. Madrid.
- Jäger W. **2010**. Metabolism of terpenoids in animal models and humans. In: Baser, K.H.C & Buchbauer, G. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Jennings, W., Mittlefelhdt, E. & Strempel, P. **1997**. Analytical Gas Chromatography. **Academic Press**. St. Louis.
- Johnson, C.B., Kazantzis, A., Skoula, M., Mitteregger, U. & Novak, J. **2004**. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. **Phytochemistry Annals**, 15, 286-292.
- Jordán M.J., Martínez R.M., Cases M.A. & Sotomayor J.A. **2003**. Watering level effect on *Thymus hyemalis* L. essential oil yield and composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 5420-5427.
- Jordán, M.J., Martínez, R.M., Goodner, L.K., Baldwin, E.A. & Sotomayor, J.A. **2006**. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, 24, 253-263.
- Kalembe, D. & Kunicka, A. **2003**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, 10, 813-829.

- Karousou, R., D. N. Koureas & S. Kokkini. **2005**. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in natura 2000 sites of Crete. **Phytochemistry**, 66, 2668-2673.
- Kennedy, D.O & Wightman, E.L. **2011**. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. American Society for Nutrition. **Advanced Nutrition**, 2, 32-50.
- Kennedy, D.O, Pace, S., Haskell, C., Okello, E., Milne, A. & Scholey, A. **2006**. Sage leaf extract reduces anxiety in clinical trial. **Neuropsychopharmacology**, 31, 845-852.
- Kesselmeier, J. & Staudt, M. **1999**. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmosphere Chemistry**, 33, 23-88.
- Kesselmeier, J., Ciccioli, P., Kuhn, U., Stefani, P., Biesenthal, T., Rottenberger, S., Wolf, A., Vitullo, M., Valentini, R., NOBRE, a., Kabat, P. & Andreae, M.O. **2002**. Volatile organic compound emissions in relation to plant carbon fixation and the terrestrial carbon budget. **Global Biogeochemical Cycles**, 16, 73.
- Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H., Hemmati, K. & Khalighi, A. **2011**. The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Medicinal Plants Research**, 5, 5360-5365.
- Kintzios, E. **2000**. The sage. The genus *Salvia*. **Hardwood Academic Publishers**, Amsterdam.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M. & Vigneschow, H. **1986**. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Progress in Essential Oil Research: 16<sup>th</sup> International Symposium of Essential Oils. Brunke, E.J. **De Gruyter**, Berlin. 429-445.
- Kofujita, H., Fujino, Y., Ota, M. & Takahashi, K. **2006**. Antifungal diterpenes from the bark of *Cryptomeria japonica* D. Don. **Holzforschung**, 60, 20-23.
- Kordali, S., Kesdek, M. & Cakir A. **2007**. Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae). **Industrial Crops and Products**, 26, 278-297.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. **2011**. A review of the antioxidant potential of medicinal plants species. **Food and Bioproducts Processing**, 89, 217-233.
- Kubeczka, K.H. & Formáček. **2002**. Essential oils analysis: by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. **John Wiley & Sons**. Chichester.

- Kubezcka, K.H. **2010**. History and Sources of Essential Oil Research. In: Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. Baser, K.H.C & Buchbauer, G. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Kumar, N. & Motto, M.G. **1986**. Volatile constituents of peony flowers. **Phytochemistry**, 25, 250-253.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. & Satya, S. **2011**. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. **Industrial Crops and Products**, 34, 802-817.
- Lahlou, M. & Berrada, R. **2003**. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatised in Morocco. **Flavour and Fragrance Journal**, 18, 124-127.
- Laird S.A. & Pierce A.R. **2002**. Promoting sustainable and ethical botanicals. Strategies to improve commercial raw material sourcing. Results from the sustainable botanicals pilot project. Industry surveys, case studies and standards collction. **Rainforest Alliance**. New York.
- Lamien-Meda, A., Schmiderer, C., Lohwasser, U., Börner, A., Fran, C. & Novak, J. **2009**. Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. **Flavour and Frangance Journal**, 25, 75-82.
- Lang, G. & Buchbauer, G. **2011**. A review on recent research (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, 27, 13-39.
- Lange D. **2004**. Medicinal and Aromatic Plants: trade, production and management of botanical resources. Proc. XXVI IHC-Future for Medicinal and Aromatic Plants. Eds. L.E. Craker et al. **Acta Horticulturae** 629.
- Lawrence, B.M. **1990**. Spanish sage oil. **Perfumer and Flavorist**, 15, 62-63.
- Lawrence, B.M. **2002**. Commercial essential oils: Truths and consequences. In : Advances in flavours and fragrances: From the sensation to the synthesis. Swift, K.A.D. **Royal Society of Chemistry RSC**, Cambridge.
- Lesschen, J.P., Kok, K., Verburg, P.H. & Cammeraat, L.H. **2007**. Identification of vulnerable areas for gully erosion under different scenarios of land abandonment in Southeast Spain. **Catena**, 71, 110–121.
- Letchamo, W. & Gosselin, A. **1994**. Effects of HPS supplemental lighting and soil water levels on growth, essential oil content and composition of two thyme (*Thymus vulgaris* L.) clonal selections. **Canadian Journal of Plant Science**, 75, 231-238.

## BIBLIOGRAFÍA

- Letessier, M.P., Svodoba, K.P. & Walters, D.R. **2001**. Antifungal activity of the essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis*). **Journal of Phytopathology**, 149, 11-12.
- Leung, A.Y. & Foster, S. **1996**. Encyclopedia of common natural ingredients. **Chichester John Wiley**. New York.
- Levitt, J. **1980**. In: Responses of Plants to Environmental Stresses, vol. I, **Academic Press, New York**, pp. 347-470.
- Lima, C.F., Andrade, P.B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. **2005**. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, 383-389.
- Loziene, K. & Venskutonis, P.R. **2005**. Influence of environmental and genetic factors on the stability of the essential oil composition of *Thymus pulegioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 33, 517-525.
- Loziene, K. & Venskutonis, P.R. **2010**. Chemotypes of interspecific hybrid of *Thymus x oblongifolius* Opiz growing wild in Lithuania and effects of cloning on essential oil composition. **Journal of Essential Oils Research**, 22, 581-588.
- Llusía, J. & Peñuelas, J. **2000**. Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. **American Journal of Botany**, 87, 133-140.
- Lubbe, A. & Verpoorte, R. **2011**. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, 34, 785-801.
- Maffei, M.E. **2010**. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, 76, 612-631.
- McGimpsey, J. A., Douglas, M. H., Klink, J. W., van Beauregard, D. A. & Perry, N. B. **1994**. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. **Flavour and Fragrance Journal**, 9, 347-352.
- Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Solic, E., Abadzic. & Siljak-Yakovlev, S. **2007**. Effects of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas. and *S. officinalis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35, 473-478.
- Malekzadeh, M., Mirmazloun, S.I., Mortazavi, S.N., Panahi, M. & Angorani, H.R. **2011**. Physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn. cv. Budakalászi) under drought stress. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5, 2886-2889.

- Marcos, M. E., García, M. C., Muñoz, F. & Polo, L. M. **1988**. Essential oils of *Salvia lavandulaefolia* Vahl. In: Flavors and Fragrances: A World Perspective. **Elsevier Science**. Amsterdam.
- Margesin, G. & Schinner, F. **2005**. Manual of Soil Analysis. Monitoring and assessing soil bioremediation. **Springer-Verlag**. Berlin Heidelberg.
- Martin, D.M., Gershenzon, J. & Bohlmann, J. **2003**. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce, **Plant Physiology**, 132, 1568-1599.
- Martinetti, L., Quatrini, E., Bononi, M. & Tateo, F. **2006**. Effect of the mineral fertilization on the yield and the oil content of two cultivars of rosemary. **Acta Horticulturae**, 723, 399-404.
- Marotti, M., Piccaglia, R. & Giovanelli, E. **1994**. Effects of variety and ontogenetic stage on the essential oil composition and biological activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Journal of Essential Oil Research**, 6, 57-62.
- Masotti, V., Juteau, F., Bessi re, J.M. & Viano, J. **2003**. Seasonal and phonological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 7115-7121.
- Menary, R.C. **1994**. Factors influencing the yield and composition of essential oils, II: Nutrition, irrigation, plant growth regulators, harvesting and distillation. **Proc. 4<sup>emes</sup> Rencontres Internationales Nyons**.
- M  th  , I., M  th  , A., Hohmann, J. & Janics  k, G. **2010**. Volatile and some non-volatile chemical constituents of Mediterranean *Salvia* species beyond their native area. **Israel Journal of Plant Sciences**, 58, 273 – 277.
- Mauchline, A.L., Osborne, J.L., Martin, A.P., Poppy, G.M. & Powell, W. **2005**. The effects of non-host plant essential oil volatiles on the behaviour of the pollen beetle *Meligethes aeneus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 114, 181-188
- Mauchline, A.L., Brikett, M.A., Woodcock, M., Pichett, J.A., Osborne, J.L. & Powell, W. **2008**. Electrophysiological and behavioural responses of the pollen beetle, *Meligethes aeneus*, to volatiles from a non-host plant, lavender, *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae). **Arthropod-Plant Interactions**, 2, 109-115.
- Mendoza, L., Wilknes, M., Urzua, A. **1997**. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 58, 85-88.

## BIBLIOGRAFÍA

- Michavila, A., Fernandez-Gadea, F. & Rodriguez, B. **1986**. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lavandulaefolia*. **Phytochemistry**, 25, 266-268.
- Miguel, M., Duarte, F., Venancio, F. & Tabares, G. **2004**. Composition of the essentials oils from Portuguese *Thymus albicans* collected at different regions of Ria Formosa (Algarve). **Journal of Essential Oil Research**, 16, 308-312.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. **2009**. Aplicación en España del “Chequeo Médico” de la P.A.C. Ed. **M.M.A.R.M.** Madrid.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. **2010**. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivo. Resultados Nacionales y Autonómicos. Ed. **M.M.A.R.M.** Madrid.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. **2011**. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos. Resultados Nacionales y Autonómicos. Ed. **M.A.R.M.** Madrid.
- Mondello, L., Lewis, A.C. & Bartle, K.D. **2002**. Multidimensional Gas Chromatography. **John Wiley & Sons**. England.
- Morales, R. **2010**. Flora Ibérica. Vol. XII. **Real Jardín Botánico, CSIC**, Madrid.
- Munné-Bosch, S. & Peñuelas, J. **2003**. Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. **Annals of Botany**, 92, 385-391.
- Munné-Bosch, S., Mueller, M., Schwarz, K. & Alegre, L. **2001**. Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. **Journal of Plant Physiology**, 158, 1431-1437.
- Munné-Bosch, S. & Alegre, L. **2000**. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta**, 210, 925-931.
- Muñoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I. & Segura, J. **2007**. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35, 479-488.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **1997**. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility test, 6<sup>th</sup> Edition. **Approved Standard**. M2-A6, Wayne.
- Nacif, I. & Mazzafera P. **2005**. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43, 241-248.

- Nataka, M., Kanazawa, K., Mizuno, M., Ueno, N., Kobayashi, T., Danno, G. & Minamoto, S. **1989**. Herb-water extracts markedly suppress the mutagenicity of Trp-P-2. **Agricultural and Biological Chemistry**, 53, 1423- 1425.
- Nemeth, E. **2005**. Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. **Journal of Essential Oil Research**, 17, 501-512.
- Niinemets, U., Loreto, F., Reichsteni, M. **2004**. Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compounds emissions. **Trends in Plant Science** 9, 180-186.
- Novak, J., Novak, S., Bitsch, C. & Franz, C. **2000**. Essential oil composition of different underground parts of *Valeriana celtica* ssp. from Austria and Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, 15, 40-42.
- Novak, J., Bitsch, C., Pank, F., Langbehn, F. & Franz, C. **2002**. Distribution of the *cis*-sabinene hydrate acetate chemotype in accessions of marjoram (*Origanum majorana* L.). **Euphytica**, 127, 69-74.
- Novak, J., Marn, M. & Franz, C. **2006**. An  $\alpha$ -pinene chemotype in *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, 18, 239-241.
- Okuhata, H., Ikeda, K., Miyasaka, H., Takahashi, S., Matsui, T., Nakayama, H., Kato, K.O. & Hirata, K. **2010**. Floricultural *Salvia* plants have a high ability to eliminate bisphenol A. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, 1, 99-101.
- Ormeño, E., Fernandez, C., Bousquet-Melou, A., Greff, S., Morin, E., Robles, C., Vila, B., & Bonin, G. **2007**. Monoterpene and sesquiterpene emissions of three Mediterranean species through calcareous and siliceous soils in natural conditions. **Atmosphere environment**, 41, 629:639.
- Ormeño, E., Baldy, V., Ballini, C. & Fernandez, C. **2008**. Production and Diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: Effects of soil nutrients. **Journal of Chemical Ecology**, 34, 1219-1229.
- Owen, S., & Peñuelas, J. **2005**. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. **Trends in Plant Science**, 10, 420-426.
- **PAI09-0011-7640**: Análisis de la variación del contenido de aceites esenciales (cantidad y calidad de los principios activos) en clones de varias especies de plantas aromáticas y medicinales. **Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha**.
- Palá-Paúl, J., Usano-Aleman, J., Soria, A.C., Pérez-Alonso, M.J., & Brophy, J.J. **2008**. Essential Oil Composition of *Eryngium campestre* L. Growing in Different Soil Types. A Preliminary Study. **Natural Products Communications**, 3, 1121-1126.



## BIBLIOGRAFÍA

- Paolini, J., Barboni, T., Desjobert, J.M., Djabou, N., Muselli, A. & Costa, J. **2010**. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, 38, 865-874.
- Pansu, M. & Gautheyrou, J. **2003**. Handbook of Soil Analysis. Mineralogical, organic and inorganic methods. **Springer-Verlag**. The Netherlands.
- Patel, B.S., Amin, A.U., Patel, K.P. & Patel, M.M. **2003**. Influence of organic manures alone or in combination with inorganic fertilizer on productivity of winter drilled fennel (*Foeniculum vulgare*). **Indian Journal of Agronomy**, 48, 232-234.
- Paula, J.A.M., Ferri, P.H., Bara, M.T.F., Tresvenzol, L.M.F., Sá, F.A.S. & Paula, J.R. **2011**. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 39, 643-650.
- Pauli, A. & Schilcher, H. **2010**. In: Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. Baser, K.H.C & Buchbauer, G. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Pavela, R. **2005**. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. **Fitoterapia**, 76, 691-696.
- Pavela, R., Sajfrtová, M., Sovová, H., Bárnét, M. & Karban, J. **2010**. The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, 31, 449-454.
- Peñuelas, J. & Llusia, J. **2002**. Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, 155, 227-237.
- Pereira, S.I., Santos P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiredo, L.R., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. **2000**. Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). **Phytochemistry**, 55, 241-246.
- Pérez-Galindo, M.P. **2005**. *Salvia lavandulifolia* Vahl subsp. oxyodon: evaluación de su aceite esencial y su incidencia en el medio ambiente según intensidades de recolección. Tesis doctoral. **Facultad de Farmacia. Universidad de Granada**.
- Pérez-Sanchez, R., Uberta, J.L., Lafont, F. & Galvez, C. **2008**. Composition and variability of the essential oil in *Thymus zizis* from Southern Spain. **Journal of Essential Oil Research**, 20, 192-200.

- Peroy, M.C. **2003**. El cluster del sector de les plantes aromàtiques i medicinals a Espanya. Proyecto final de carrera. **Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. Universitat de Lleida**.
- Perry, N.B., Andreson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, J., McGimpsey, J.A. & Smallfield, B.M. **1999**. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts season and sites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 2048-2054.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Theobald, A., Jenner, P. & Perry, E.K. **2000**. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. **Journal of Pharmacology**, 52, 895–902.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Sampson, J., Theobald, A.E., Hart, S. & Lis-Balchin, M. **2001**. In-vitro activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacology**, 53, 1347-56.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Jenner, P., Keith, A. & Perry, E.K. **2002**. *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo. **Phytomedicine**, 9, 48-51.
- Perry, N.S.L., Bollen, C., Perry E.K. & Ballard, C. **2003**. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 75, 651-659.
- Piccaglia, R. **1998**. Aromatic plants: a World of flavouring compounds. **Agro-food-Industry high technology**, 9, 12-15.
- **PII10-0001**: Estudio de los efectos ambientales y agronómicos sobre la producción de aceites esenciales (calidad y cantidad de los principios activos) en plantas aromáticas y medicinales de interés en Castilla-La Mancha. Aplicaciones prácticas para el sector. **Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha**.
- Petropoulos, S.A., Daferera, D., Polissiou, M.G. & Passam, H.C. **2008**. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. **Scientia Horticulturae**, 115, 393-397.
- Pferschy-Wenzig, E. M., Kunert, O., Presser, A. & Bauer, R. **2008**. In vitro anti-inflammatory activity of Larch (*Larix decidua* L.) sawdust. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 11688-11693.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. **2002**. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, 5, 237-243.

- Pitarevic, K., Kuftinec, J., Blazevic, N. & Kustrak, D. **1984**. Seasonal variation of the essential oil yield and composition of Dalmatian sage, *Salvia officinalis*. **Journal of Natural Products**, 47, 409-412.
- Putievsky, E., Ravid, U., Diwan-Rinzler, N. & D. Zohary. **1990**. Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill. and their hybrids. **Flavour and Fragrance Journal**, 5, 121-123.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. & Ignacimuthu, S. **2006**. In vitro antibacterial activity of some plants Essentials oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 6, 39.
- Pybus, D. & Sell, C. **1999**. Perfumery material of natural origin. In: The chemistry of fragrances. **Royal Society of Chemistry**. Cambridge.
- Qiang, Z., Ye, Z., Hauck, C., Murphy, P.A., McCoy, J., Widrlechner, M.P., Reddy, M.B. & Hendrich, S. **2011**. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, 1107-1112.
- Rahimmalek, M., Tabatabaei, B.E.S., Arzani, A. & Etemadi. **2009**. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Biochemical Systematics and Ecology**, 37, 354-361.
- R Development Core Team R. **2007**. A Language and Environment for Statistical Computing, 2.6.1. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria.
- Robles, C & Garzino, S. **1999**. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. **Phytochemistry**, 53, 71-75.
- Ramos, A.A., Lima, C.F, Pereira, M.L., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. **2008**. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells. **Toxicology Letters**, 177, 66-73.
- Ramos, A. A., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C & Collins, A.R. **2010**. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 7465–7471.
- Rasmann, S., Kollner, T.G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. & Turling, T.C.J. **2005**. Recruitment of entomopathogenetic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, 434, 732-737.

- Rauchensteiner, F., Nejati, S. & Saukel, J. **2004**. The *Achillea millefolium* group (Asteraceae) in Middle Europe and the Balkans: a diverse source for the crude Herba Millefolii. **Journal of Traditional Medicines**, 21, 113-119.
- Real Farmacopea Española. **2002**. 2ª Ed. **Ministerio de Sanidad y Consumo**. Madrid.
- Reinhard, J., Srivivasan, M.V, & Zhang, S. **2004**. Scent-triggered navigation in honeybees. **Nature**, 427-411.
- Ríos, J.L. & Recio, M.C. **2005**. Medicinal Plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100, 80-84.
- Rivas Martínez, S. **1987**. Memoria del mapa de series de vegetación de España. **Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación**. Madrid.
- Romagni, J.G, Allen, S.N. & Dayan, F.E. **2000**. Allelopathic effects of volatile cineols on two weedy plant species. **Journal of Chemical Ecology**, 26, 303-313.
- **RTA 2005-00168-C04-04**: Prospección, recolección y conservación de germoplasma, caracterización química, selección, estudios de propagación y cultivo ecológico de poblaciones silvestres de P.A.M. **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)**.
- **RTA2008-0047**: Incidencia del cultivo de plantas aromáticas y medicinales, y su viabilidad económica, sobre la erosión de suelos agrícolas. Cuantificación de la erosión/depósito aplicando tecnologías tradicionales y modernas. **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)**.
- **RTA 2009-00062-C03-01**: Selección y mejora por su comportamiento agronómico y riqueza en principios activos de poblaciones silvestres españolas de las especies *Lavandula latifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulifolia* y *Thymus mastichina* ya caracterizadas químicamente. **Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)**.
- Rubiolo, P., Matteodo, M., Bichhi, C., Appendino, G., Gnani, G., Berteà, C. & Maffei, M. **2009**. Chemical and biomolecular characterization of *Artemisia umbelliformis* Lam., an important ingredient of the alpine liqueur “genepi”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 3436-3443.
- Rzepa, J., Wojtal, L., Staszek, D., Grygierczyk, G., Labe, K., Hajnos, M., Kowalska, T. & Waksmundzka-Hajnos, M. **2009**. Fingerprint of selected salvia species by HS-GC-MS analysis of their volatile fraction. **Journal of Chromatography Science**, 47, 575-580.

## BIBLIOGRAFÍA

- Sáez, F. **1999**. Essential oil variability of *Thymus baeticus* growing wild in southeastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, 27, 269-276.
- Sáez, F. **2001**. Volatile oil variability in *Thymus serpylloides* sp. *gadorensis* wild in southern eastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, 29, 189-198.
- Said-Al Ahl, H.A.A, Omer, E.A. & Naguib. **2009**. Effect of water stress and nitrogen fertilizer on herb and essential oil of oregano. **International Agrophysics**, 23, 269-275.
- Salamon, I. **2007**. Effect of the internal and external factors on yield and qualitative–quantitative characteristics of chamomile essential oil. **Acta Horticulturae**, 749, 45-64.
- Samoylenko, V., Dunbar, D.C., Gafur, M.D. Abdul., Khan, S.I., Ross, A.S., Mossa, J.S., El-Feraly, F.S., Tekwani, B.L., Bosselaers, J. & Muhammad, I. **2008**. Antiparasitic, nematocidal and antifouling constituents from *Juniperus* berries. **Phytotherapy Research**, 22, 1570-1576.
- Sanboli, A., Babakhani, B. & Mehrabian, A.R. **2006**. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Zeitschrift fur Naturforsch**, 61, 160-164.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. & Sangwan, R.S. **2001**. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, 43, 3-21.
- Santos-Gomes, P.C. & Fernandes-Ferreria, M. **2001**. Organ- and Season-Dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 2908-2916.
- Sarker, B.C., Hara, M. & Uemura, M. **2005**. Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. **Scientia Horticulturae**, 103, 387-402.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. & Perry, E.K. **2003**. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 75, 661-668.
- Savelev, S.U., Okello, E.J. & Perry, E.K. **2004**. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. **Phytotherapy Research**, 18, 315-24.
- Schmelz, E.A., Alborn, H.T., Engelberth, T. & Umlinson, J.H. **2003**. Nitrogen deficiency increases volicitin-induced volatile emission, jasmonic acid accumulation, and ethylene sensitivity in maize. **Plant Physiology**, 133, 295-306.

- Schmiderer, C., Grassi, P., Novak, J. & Franz, C. **2008**. Diversity of essential oil glands of spanish sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl, Lamiaceae). **Natural Products Communications**, 3, 1155-1160.
- Senol, F. S., Orhan I. E., Erdem S. A., Kartal, M., Sener, B., Kan, Y., Celep, F., Kahraman, A. & Dogan, M. **2011**. Evaluation of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of wild and cultivated samples of sage (*Salvia fruticosa*) by activity-guided fractionation. **Journal of Medicinal Food**, 14, 1476-1483.
- Sell, C. **2010**. In: Baser, K.H.C & Buchbauer, G. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Sharkey, T.D., Chen, X.Y. & Yeh, S. **2001**. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. **Plant Physiology**, 125, 2001-2006.
- Shrinivas, K. & Kudli, A.P. **2008**. Market research data on Essential oils and absolutes used in fragrance and flavour industry. **Businnes**. <http://goarticles.com/caterogy/businnes>
- Sifola, M.I. & Barbieri, G. **2006**. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. **Scientia Horticulturae**, 108, 408-413.
- Singh, M. & Ramesh, S. **2000**. Effect of irrigation and nitrogen on herbage, oil yield and water-use efficiency in rosemary grown under semi-arid tropical conditions. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, 22, 659-662.
- Singh, M., Ganesha Rao, R.S. & Ramesh, S. **1997**. Irrigation and nitrogen requirement of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Sleud) Wats.) on a red sandy loam soil under semi-arid tropical conditions. **Journal of Essential Oil Research**, 9, 569-574.
- Skoula, M., Abidi, C. & Kokkalou, E. **1996**. Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* growing wild in Crete (Greece). **Biochemical Systematics and Ecology**, 24, 255-260.
- Schmidt, E. **2010**. In: Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. Baser, K.H.C & Buchbauer, G. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Soria, A.C., Esteban, J., Morales, R., Martín-Álvarez, P. & Sanz, J. **2008**. Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. **Botanica Complutensis**, 32, 225-236.

- Sotomayor J.A., Martínez R.M., García A.J. & Jordán M.J. **2004**. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 5418-5424.
- Soyulu, E.M., Soyulu, S., Kurt, S. **2006**. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathology**, 161, 119-128.
- Statsoft. **2001**. Statistica 6.0. **StatSoft, Inc.** U.S.A.
- Steinhoff, B. **2003**. Laws and regulation on medicinal and aromatic plants in Europe. **Acta Horticulturae**, 678, 12-33.
- Svodoba, K.P., Svodoba, T.G. & Syred, A.D. **2000**. Secretory Structures of Aromatic and Medicinal Plants. **Middle Travelly: Microscopix Publications**. Powys, Wales.
- Tabanca, N., Kirimer, N., Demirci, B., Demirci, F. & Başer K.H.C. **2001**. Composition and the antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 4300-4303.
- Taviani, P., D. Rosellini, and F. Veronesi. **2002**. Variation for Agronomic and Essential Oil traits among wild populations of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from Central Italy, In Breeding Research on Aromatic and Medicinal Plants. Johnson, C.B & Franz, C. pp. 353–358. Binghampton: **Haworth Press**.
- Teuber, M., Zimmer, I., Kreuzwieser, J., Ache, P., Polle, A., Rennenberg, H., Schnitzler, J.P. **2008**. VOC emissions of Grey poplar leaves as affected by salt stress and different N sources. **Plant Biology**, 10, 86-96.
- Thripathi, A.K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. & Bhattacharya P.R. **2009**. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, 15, 52-53.
- Tildesley, N.T.J., Kennedy, D.O., Perry, E.,K., Ballard, C.G., Savelev, S., Wesnes, K.A. & Scholey, A.B. **2003**. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 75, 669-674.
- Tildesley, N.T.J., Kennedy, D.O., Perry, E.K., Ballard, C.G., Wesnes, K.A. & Scholey, A.B. **2005**. Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. **Physiology & Behavior**, 83, 699-709.

- Tomás-Lorente, F., García-Grau, M.M., Tomás Barberán, F.A. **1988**. The wastes of the industrial treatment of *Salvia lavandulaefolia* as a source of biologically active falvonoids. **Fitoterapia**, 59, 62-67.
- Tommasi, L., Negro, C., Cerfeda, A., Nutricali, E., Zuccarello, V., De Bellis, L. & Miceli, A. **2007**. Influence of environmental factores on Essentials oils variability in *Thymbra capitata* (L.) Cav. Growing wild in Southern Puglia (Italy). **Journal of Essential Oil Research**, 19, 572-580.
- Trindade, H., Costa, M.M., Lima, S.B., Pedro, Figueiredo, A.C. & Barroso, J.G. **2009**. A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for He characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). **Biochemical Systematics and Ecology**, 37, 670-677.
- Trivino, M.G. & Johnson, C.B. **2000**. Season has a major effect on the essential oil yield response to nutrient supply in *Origanum majorana*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 75, 520-527.
- Tsiri, D., Kretsi, O., Chinou, I.B. & Spyropoulos, C.G. **2003**. Composition of fruit volatiles and annual changes in the volatiles of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Growing in Greece. **Flavour and Fragrance Journal**, 18, 244-247.
- Turtola, S., Manninen, A.N., Rikala, R. & Kainulainen, P. **2003**. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in scots pine and Norway spruce seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, 29, 1981-1995.
- Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I.B. & Harvala, C. **2001**. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. **Planta Medica**, 67, 81-83.
- Ulubelen, A., Topcu, G. & Johansson C. B. **1997**. Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. **Journal of Natural Products**, 60, 1275-1280.
- Ulubelen, A. **2000**. In: The sage. The genus *Salvia*. Kintzios, S. **Harwood Academic Publisher**, Amsterdam.
- Usano-Aleman, J., Herráiz-Peñalver, D., Cuadrado, J., De Benito, B., Sánchez, O. & Palá-Paúl, J. **2011**. Ecological production of lavenders in Cuenca province (Spain). A study of yield production and quality of the essential oils. **Botanica Complutensis**, 35, 147-152.
- Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Ozedk, T., Demirici, B. & Baser, K.H.C. **2007**, Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the anmicrobial activity. **South African Journal of Botany**, 73, 441-448.



- Verheggen, F.J., Arnaud, L., Bartram, S., Gohy, M. & Haubruge, E. **2008**. Aphid and plant volatiles induce oviposition in a aphidophagous hoverfly. **Journal of Chemical Ecology**, 34, 301-307.
- Vukovic-Gacic, B., Nikcevic, S., Beric-Bjedov, T., Knezevic-Vukcevic, J. & Simic, D. **2006**. Antimutagenic effect of Essentials oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpens against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry Toxicology**, 44, 1730-1738.
- Walker, J.B., Sytsma, K.K., Treutlein, J. & Wink, M. **2004**. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. **American Journal of Botany**, 91(7), 1115-1125.
- Walker, J.B. & Sytsma, K.J. **2007**. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of staminal lever. **Annals of Botany**, 100, 375-391.
- Wang, A., Zhang F., Huang, F., Yin, X., Li, H., Wang, Q., Zeng, Z. & Xie, T. **2010**. New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. **Journal of Medicinal Plants Research**, 4, 847-856.
- Werker, E., Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N. & Katzir, I. **1993**. Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Annals of Botany**, 71, 43-50.
- Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T. & Cavanagh, H.M.A. **2003**. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 76-81.
- Wichtel, M. **2002**. Teedrogen und Phytopharmaka. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart.
- Wink, M. **2003**. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, 64, 3-19.
- Vaughn, S. F. & Spencer, G. F. **1993**. Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. **Weed Science**, 41, 114-119.
- Zheljazkov, V., Pickett, K.M., Caldwell, C.D., Pincock, J.A., Roberts, J.C. & Mapplebeck, L. **2008**. Cultivar and sowing date effects on seed yield and oil composition of coriander in Atlantic Canada. **Industrial Crops and Products**, 28, 88-94.

- Zheljazkov, V., Astatkie, T. & Hristov, A.N. **2012**. Lavender and hyssop productivity, oil content, and bioactivity as a function of harvest time and drying. **Industrial Crops and Products**, 36, 222-228.
- Zhetab-Salmasi, S., Javanshir, A., Omidbaigi, R., Alyari, H. & Ghassemi-Golezani, K. **2001**. Effects of water supply and sowing date on permformance and essential oil production of anise (*Pimpinella anisum* L.). **Acta agronomica Hungarica**, 49, 75-81.
- Zarzuelo, A., Gámez, J.M., Utrilla, P., Jiménez, J. & Jiménez I. **1995**. The luteolin 5-rutinoside from *Salvia lavandulifolia*. **Phytochemistry**, 40, 1321-1322.
- Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G. & Mondello, L. **2010**. In: Baser, K.H.C & Buchbauer, G. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Application. **Taylor & Francis Group**. Boca Ratón.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F. & Kozai, T. **2005**. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metaoblite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43, 977-984.
- Zupko, I., Hohmann, J., Redei, D., Falkay, G., Janicsak, G. & Mathe, I. **2001**. Antioxidant activity of leaves of Salvia species in enzyme-dependent and enzyme independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. **Planta Medica**, 67, 366-8.

